

Archiv für Hygiene und Bakteriologie

VERLAG URBAN & SCHWARZENBERG, MÜNCHEN-BERLIN

Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten

Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Knorr)

Anaerobe Myxobakterien, neue Mikroben in der menschlichen Mundhöhle*



Von W. Gräf

Mit 40 Abbildungen

Vorwort

Im Verlaufe von experimentellen Studien über die *Fusospirochätosen* oder *Fusospirillosen*** der menschlichen Mundhöhle wurden wir auf einen Keim aufmerksam, der morphologisch zunächst in die Gruppe der Fusobakterien zu passen schien, dessen ungewöhnliche Bewegungsformen ihn aber von dem als unbeweglich definierten Genus *Fusobakterium* unterschieden. Dieser Keim — wir konnten solche Bakterien später als häufige Bewohner der Mundhöhle nachweisen — zeigte zunächst bei Beobachtung mit dem Phasenkontrastmikroskop im hängenden Tropfen eine sehr eigentümliche Beweglichkeit: Mit einem Ende an der Deckglasoberfläche fixiert, vollführte das freie Ende peitschenartige Rotationsbewegungen, die mit Sicherheit als Eigenbeweglichkeit und nicht als strömungsbedingt oder durch Brownsche Molekularbewegung hervorgerufen erkannt wurden.

Bei weiterer Kultivierung des Keimes in flüssigen Nährmedien stellten wir dann bei Lebend-Betrachtung mit Überraschung fest, daß die fadenförmigen Keime an der Glasoberfläche haftend, eine Kriechbewegung vollführten. Durch diese Kriechbewegung, die gleichzeitig eine ungewöhnliche Flexibilität des Keimes offenbarte wurde eine verhältnismäßig rasche Ortsbewegung bewirkt. Die auffallende kriechende Fortbewegungsart, die mit Sicherheit nicht durch einen Geißelapparat hervorgerufen wird, veranlaßte uns diese besondere Gruppe von „Fusobakterien“ näher zu untersuchen und in der Literatur nach Beschreibungen solcher oder ähnlicher Keime zu fahnden.

* Herrn Prof. Dr. N. Henning zum 65. Geburtstag gewidmet. In gekürzter Form am 21. 6. 1961 bei der Medizinischen Gesellschaft Erlangen vorgetragen.

** je nach Überwiegen von Spirochäten oder Spirillen.

In Bezug auf die Beweglichkeit der Fusobakterien war schon bei den ersten Untersuchern dieser Keime keine Übereinstimmung vorhanden. Während Vincent (1896) seine Keime für unbeweglich hält, behauptet Plaut (1907) das Gegenteil. Der Großteil der folgenden Beobachter ist jedoch der Ansicht, daß die Fusobakterien keine Beweglichkeit besitzen. (Mühlens und Hartmann, 1906; Ellermann, 1907; Krumwiede und Pratt, 1913.) Auch M. Knorr, der im Jahre 1922 eine erste zusammenfassende Beschreibung und Klassifizierung des Genus *Fusobakterium* vorgenommen hat, konnte bei keinem seiner Stämme eine Beweglichkeit nachweisen. Spätere Untersucher wie Varney (1927), Henriksen (1937) und Boe (1941) haben sich dieser Meinung angeschlossen.

Trotzdem hat es immer wieder Autoren gegeben, die für die Beweglichkeit der Fusobakterien eingetreten sind. (Bernheim und Pospischill, 1898; Graupner, 1902; Veszpremi, 1907; Leiner, 1907; Plaut, 1907; Costa, 1909) Die Art und das Ausmaß der beschriebenen Bewegungsformen variieren dabei von leichten Oscillationen bis zur schnellen aktiven Ortsbewegung.

Eine weitere Verwirrung entstand, als Boe (1941) zwar keine Beweglichkeit, jedoch peritriche Begeißelung bei seinen Stämmen sehen wollte, während eine Reihe von anderen Autoren (Prévot, 1940; Macdonald, 1953; Berger, 1956) zwar Beweglichkeit gewisser Fusobakterien behaupteten, das Vorhandensein von Geißeln jedoch in Abrede stellten.

Die Frage, ob die bei manchen Autoren beschriebenen begeißelten Fusobakterien auf einer Verwechslung mit anderen Keimen, z. B. gestreckte Formen von Spirillen zurückzuführen sind oder ob man nicht doch wie z. B. bei den Salmonellen begeißelte und unbegeißelte Varianten bei dem Genus *Fusobakterium* annehmen kann, mag hier offen bleiben. In Hinblick auf die von uns gezüchteten Stämme scheint es uns jedoch unmöglich auch noch unbegeißelte und dennoch bewegliche Keime mit all ihren funktionellen Sonderheiten im Genus *Fusobakterium* unterbringen zu wollen, wie es bisher geschehen ist. (Prévot, 1940; MacDonald 1953; Berger, 1956).

Wir glauben, daß ein großer Teil der widersprechenden Befunde in Bezug auf die Beweglichkeit der Fusobakterien auf die nicht richtige Erkennung und Deutung dieser besonderen, den Fusobakterien nur äußerlich ähnlichen Bakterien beruht. Im Folgenden wollen wir versuchen aus der bisherigen Fusobakterienliteratur diejenigen Autoren zu zitieren, von denen wir annehmen, daß sie die in Frage stehende kriechende Bakterienart in Händen hatten.

Bereits im Jahre 1909 beschrieb S. Costa einen *Bazillus fusiformis* Vincent aus Meerschweincheneiter, dessen Beweglichkeit aber nur bei Sauerstoffabwesenheit vorhanden sei. Sie bestand in einer langsamen Translationsbewegung und daneben in einer lebhaften, schnellen Oscillation. „Oft stellt sich der Bazillus in die Richtung der Mikro-

skopachse ein, fixiert eines seiner Enden und bewegt das andere Ende heftig hin und her.“ Die so beschriebene Bewegungsform deckt sich gut mit unseren Beobachtungen, so daß wir eine Identität mit unseren Keimen als wahrscheinlich annehmen können.

Der nächste Autor, der wahrscheinlich die betreffenden Keime gesehen hat war T. *Shmamine* (1912). Er konnte aus einer Spirochätenmischkultur „nadelförmige“ Bakterien rein züchten, die allerdings schon nach der zweiten Generation nicht mehr fortzüchtbar waren. *Shmamine* schreibt: „Ausgesprochene Eigenbeweglichkeit konnte ich im Dunkelfeld nicht feststellen, jedoch bei einigen Exemplaren nach längeren Pausen eine Art von Zuckung wahrnehmen. Die Geißelfärbung war negativ.“ Die beiden sehr guten Fotos von diesen Keimen zeigen eine täuschende Ähnlichkeit mit den von uns gezüchteten Keimen. Interessanterweise finden sich in der zweiten Abbildung (Fig. 12 bei Sh.) neben den unregelmäßig gewundenen Keimen vereinzelt rundliche Gebilde, die — wie wir später noch zeigen werden — zum Lebenszyklus dieser Bakterienart gehören. *Shmamine* hat diesen sog. Sphäroiden keine Beachtung geschenkt. Er hielt seinen Keim für eine Übergangsform zu den Spirochäten, da in der zweiten Generation die ursprünglich geraden Stäbchen unregelmäßige Windungen aufwiesen. Nach unseren Erfahrungen sind solche gewundene Formen als Ausdruck der starken Flexibilität dieser Keime von der Fixation und Färbetechnik abhängig häufig zu beobachten.

Auch I. *Malek* und J. *Malková* (1938) scheinen diese Bakterienart kultiviert zu haben. Sie beschrieben typische Fusobakterien, die anfänglich nur streng aerobes Wachstum zeigten, später jedoch anaerobe Eigenschaften annahmen. Eine Erscheinung, die wir auf eine Mischkultur zurückführen müssen. In ihr waren Keime mit eigenartigen Rotationsbewegungen: sie deuteten dieselbe aber als Folge von Wirbelbildungen in der umgebenden Flüssigkeit.

Die erste exakte Beschreibung dieser Bakterienart erschien im Jahre 1940 von A. R. *Prévot*. Er konnte aus fäkalem Material 5 Stämme rein kultivieren und beschreibt sie als beidendig zugespitzte Stäbchen von 1,5—3 μ Länge und 0,5—0,8 μ Breite. Die Keime waren strikt anaerob und wiesen in 4—5 Tage alten Kulturen neben den Stäbchen noch rundliche Gebilde auf, die *Prévot* Sphäroide nannte, ohne ihre Bedeutung zu erkennen. Die Bewegungsform wird genau beschrieben: „Die Keime drehen sich sehr schnell um sich selbst, stoppen plötzlich und beginnen dann sich wieder in der einen oder anderen Richtung zu drehen. Zuweilen sind auch mit der Rotation kriechende Bewegungen kombiniert.“ Geißeln konnte *Prévot* färberisch nicht nachweisen. *Prévot* zählte diese 5 Stämme zu den Fusobakterien und benannte sie, der von ihm geschaffenen Einteilung entsprechend, nach ihrer typischen Drehbewegung *Fusocillus girans*. (*Fusiformis* = unbewegliche; *Fusocillus* = bewegliche Fusobakterien.) Die typische Bewegungsform und das Bildungsvermögen von Sphäroiden läßt keinen Zweifel bestehen, daß unsere Keime aus der

Mundhöhle mit denen *Prévots* identisch sind, deren Art er jedoch nicht erkannt hat.

Merkwürdig, auch in Hinblick auf die später zu besprechende Pathogenität dieser Keimart, erscheinen uns die Forschungsergebnisse von H. A. Gins (1942). Er bringt das massenhafte Auftreten von Spirillen am Zahnfleischsaum ätiologisch in Zusammenhang mit der weitverbreiteten Erkrankungsgruppe der marginalen Parodontopathien, die er auf Grund seiner Befunde als übertragbare Infektionskrankheit, der sog. Spirillose aufgefaßt haben will. Als Erreger dieser Spirillose beschreibt Gins in erster Linie zwei Spirillen, nämlich das *Spirillum buccale Fortner* und das *Spirillum buccale Koch*. Während es sich beim *Spirillum buccale Fortner* um einen peritrich begeißelten Keim mit mehr oder minder starken Windungen handelt, wird das *Spirillum buccale Koch* als „feiner, fadenförmiger Keim“ beschrieben, der keine regelmäßigen Windungen besitzt, jedoch neben unregelmäßigen Verformungen häufig sog. Haarnadel oder U-Formen aufweist. Die Abbildungen von Gins erwecken den Eindruck, daß sein *Spirillum buccale Koch* identisch ist mit der von uns beschriebenen Keimart. Wenngleich Gins Beweglichkeit bei seinem *Spirillum buccale Koch* nicht nachweisen konnte und auch Sphäroide von ihm nicht beschrieben wurden, so schließt dies eine Identität nicht aus, da die charakteristischen Kriechbewegungen dieser Keime leicht übersehen werden wenn man z. B. nur im hängenden Tropfen untersucht. Die Keime brauchen zum Kriechen und zur Rotationsbewegung eine feste Unterlage, in der freien Flüssigkeit sind sie hilflos. Auch ist die Kriechgeschwindigkeit bei den einzelnen Stämmen sehr unterschiedlich, so daß man bei den langsamen „Kriechern“ die Fortbewegung oft nur mit Mühe und bei längerer Beobachtungszeit erkennen kann, während bei den „schnellen“ Stämmen die kriechende Fortbewegung sofort ins Auge fällt.

In neuer Zeit hat MacDonald (1953) in einer Monographie die beweglichen, nichtsporenbildenden anaeroben Stäbchen der Mundhöhle in drei Gruppen eingeteilt. Während die Gruppe I (Vibrionen) und die Gruppe III (Spirillen) mittels Geißeln beweglich sind, besitzen die 5 Stämme seiner Gruppe II die charakteristischen Eigenschaften unserer geißellosen, kriechenden Keime. MacDonald beschreibt sie als Stäbchen von 4 μ bis mehreren Hundert μ Länge mit spitzen oder abgerundeten Enden. Die Beweglichkeit wird sehr treffend wiedergegeben: Peitschenartiges Schlagen um einen fixierten Pol (an der Glasoberfläche!), u. U. Rotation um diesen Pol, dann plötzliches Abstoppen und Wiederholung der Rotation in derselben oder anderen Richtung. Die Translationsbewegung erfolgt entweder durch Anheftung des einen Pols, Überschlagen und dann Anheftung des anderen Pols, oder durch Kriechbewegung.

Bei dreien der insgesamt 5 Stämme wurden diese gleitenden Bewegungen beobachtet. Geißeln waren auch im Elektronenmikroskop nicht nach-

weisbar. Die Stäbchen sind sehr flexibel bis zur Knotenbildung. Sphäroide werden in der Arbeit nicht beschrieben. MacDonald kommt bei seinen Ausführungen zu dem Schluß, daß es sich um bewegliche Fusobakterien ohne Geißeln handelt und schließt sich somit der Meinung Prévots an; allerdings schlägt er in Anlehnung an die von M. Knorr begründete Genusbezeichnung den Namen *Fusobakterium girans* vor.

Diese Bezeichnung übernimmt auch U. Berger (1956). Bei sacharolytischen Fusobakterien findet er eine eigentümliche Bewegungsform. Er beschreibt „uhrzeigerartige“ Bewegungsarten, die plötzlich um einen scheinbar fixierten Pol erfolgten oder auch länger dauernde rotierende Bewegungen um den fixierten Pol. Berger selbst scheint kriechende Bewegung nicht gesehen zu haben, denn er schreibt: „Kriechende Bewegung soll vorkommen.“ Die beigefügte elektronenoptische Aufnahme enthüllt wieder die Geißellosigkeit und zeigt ein mit unseren Keimen übereinstimmendes Bild. Auch die sog. Sphäroide konnte Berger eindeutig nachweisen, was ebenfalls mit unseren Befunden übereinstimmt.

Eine zusammenfassende Würdigung dieser Literaturübersicht macht deutlich, daß dem von M. Knorr aufgestellten Genus *Fusobakterium*, das definitionsgemäß unbewegliche, gramnegative anaerobe Stäbchen mit zugespitzten Enden umfaßt, Keime zugeordnet wurden, deren charakteristische Bewegungsform und sonstige Eigenschaften diese Zuordnung nicht rechtfertigen.

Unsere Untersuchungen sind soweit gediehen, daß wir den Beweis für das Vorkommen bisher unbekannter anaerober Myxobakterien überhaupt, insbesondere in der Mundhöhle erbringen können.

I. Herkunft, Isolierung und Fortzüchtung der Stämme

1. Die insgesamt 10 von uns isolierten Stämme der hier in Frage stehenden Keimart stammen ausnahmslos aus der menschlichen Mundhöhle. Einige der Stämme wurden aus eindeutig krankhaften Prozessen der Mundhöhle und des Kieferbereiches herausgezüchtet. So konnte ein Stamm im Sekret einer ausgedehnten Stomatitis ulcero-membranacea gefunden werden, wo dieser Keim praktisch in Reinkultur vorlag. Ein anderer Stamm konnte dagegen aus einem Zahnwurzelgranulom gezüchtet werden, das steril bei der Extraktion entnommen worden war. Die übrigen Stämme stammen vorwiegend aus entzündlich veränderten Zahnfleischtaschen und Interdentalräumen.

Ob diese Keime, die wir nunmehr häufig im Nativpräparat aus Zahnbelag, Taschensekret etc. bei Phasenkontrast oder Dunkelfeldbetrachtung beobachten konnten, als Bewohner der normalen, gesunden Mundhöhle anzusprechen sind, mag dahingestellt sein. Denn das häufige Auftreten dieser Keime in klinisch scheinbar gesunden Mundhöhlen, oder besser

ausgedrückt in Zahnfleischtaschen und sonstigen Schlupfwinkeln läßt die Frage auftauchen, ob die im Bereich des marginalen Parodontiums praktisch bei allen Menschen vorhandenen mehr oder weniger ausgeprägten entzündlichen Vorgänge die Bezeichnung „gesunde Mundhöhle“ überhaupt zulassen.

2. Die erste Isolierung eines dieser zunächst durch ihre eigenartige Bewegungsform gekennzeichneten Keime gelang uns bei Züchtung von Fusobakterien. Ein aus der Mundhöhle auf 10 % Hammelblutagarplatten im Fortnerverfahren isolierter Fusobakteriumstamm erwies sich als verunreinigt mit einem verhältnismäßig dünnen, fadenförmigen Keim. Bald stellte sich heraus, daß der betreffende Keim auf der Blutagaroberfläche nach einigen Tagen anaeroben Bebrütens als hauchartige Trübung aus dem Bereich der Fusobakterienkolonie ausgeschwärmt war. Durch Abimpfen von diesen Schwärmsaum konnte nach mehreren Passagen schließlich der Keim in Reinkultur gezüchtet werden.

Die charakteristische Kolonieform dieses Keimes und sein, bei nicht allzutrockenen Blutagarplatten stets vorhandenes Schwärmvermögen wies uns für die Isolierung weiterer solcher Stämme den einzuschlagenden Weg. Das zu untersuchende Material (Zahnbelag, Zahnfleischtaschensekret etc.) wurde zur Verdünnung in etwas Fleischwasserbouillon suspendiert; diese Suspension wurde dann auf 10 % Hammelblutagarplatten fraktioniert ausgeimpft und nach dem Fortnerverfahren etwa 7—8 Tage bei 37° C bebrütet. Nach dieser Zeit kann aus den zumeist sehr zahlreich gewachsenen Bakterienkolonien hie und da das Hervortreten eines sehr feinen, hauchartigen Rasens beobachtet werden. Dieser Schwärmsrasen ist häufig nur bei Betrachtung der Blutagaroberfläche im spiegelndem Licht wahrnehmbar und ist nicht zu verwechseln mit den daneben häufig vorhandenen Ausbreitungszonen anderer Keime z. B. von Fusobakterien, die alle von größerer Kompaktheit sind.

Sind in dem zu untersuchenden Material die betreffenden Keime in sehr großer, die übrigen Keime übertreffender Anzahl vorhanden, dann können auch die charakteristischen Oberflächenkolonien auf der Primärplatte wahrgenommen werden. Man sieht flache, leicht schleimige, zumeist grau-gelbliche, konfluierende Kolonien, die häufig einen hauchartigen Schwärmsaum aufweisen. Bei einiger Erfahrung sind diese Kolonien, die bei allen unseren Stämmen eine große Übereinstimmung zeigen, leicht von den Kolonieformen anderer Keime zu unterscheiden.

Durch Abimpfen vom Schwärmsaum solcher Kolonien ist es nicht schwer auf Blutagar-F-platten nach einigen Passagen Reinkulturen zu erhalten. Als besonders wertvoll für die Reinkultivierung hat es sich erwiesen, daß die Keime auf gut vorgetrockneten Platten das Schwärmvermögen und die Neigung zum Konfluieren nicht mehr so stark aufweisen und dann in kleinen Einzelkolonien zu erhalten sind, die leicht weiterverimpft werden können.

3. Zur Fortzüchtung der Keime unserer Stammsammlung haben wir der Sicherheit halber einen Doppelweg beschritten. Einmal wurden die Stämme laufend auf 10 % Hammelblutagarplatten im F-Verfahren weitergezüchtet, wobei die Neuverimpfung etwa alle 7—8 Tage erfolgte. Der Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß die einzelnen Stämme laufend auf Reinheit und gutes Wachstum durch die Glasplatte hindurch beobachtet werden können, ohne daß O_2 -Zutritt erfolgen muß.

Zum andern wurden parallel dazu sämtliche Keime in Leber-Leberbrühe mit 10 % Rinderserumzusatz laufend weitergezüchtet, wie es M. Knorr für die Fusobakterien angegeben hat. Die nach 3—4 Tagen diffus getrübten Röhrchen bieten den Vorteil jederzeit für Nativpräparate gut bewegliche Keime zur Verfügung zu haben.

II. Die Morphologie unserer Keime

1. Wie schon einleitend bemerkt sind die Keime in Gestalt und Größe den beidseitig zugespitzten Fusobakterien (Abb. 6) sehr ähnlich. Ein üblicherweise gefärbtes Direktpräparat z. B. von Sekret aus einer entzündlich veränderten Zahnfleischtasche kann das typische Bild der allenthalben bekannten Fusospirochätose bieten, obwohl — wie wir im Nativpräparat nachweisen konnten — viele, ja in manchen Fällen fast alle beidseitig zugespitzt erscheinenden, spindelförmigen „Fusobakterien“ die typischen Kriech- und Gleitbewegungen unserer Keime vollführen. Die rein morphologische Ähnlichkeit mit den Fusobakterien war Ursache, daß die Keime dieser grundsätzlich anders gearteten Bakteriengruppe immer wieder als Fusobakterien angesprochen und unzutreffend als besondere Arten dieses Genus bezeichnet wurden.

MacDonald (1953) beschreibt seine geißellosen, beweglichen Keime aus der Mundhöhle als dünne Stäbchen oder Fäden von 5 bis mehrere Hundert μ Länge, 0,2 bis 1 μ Dicke mit spitzen oder abgerundeten Enden. Seine beigefügten Abbildungen, insbesondere auch die elektronenoptischen Aufnahmen schließen jeden Zweifel an der Identität seiner Keime mit den unserigen aus. Jedoch konnte auch ihn die starke Flexibilität und die eigenartige kriechende Fortbewegungsart der Keime nicht davon abhalten sie unter der Bezeichnung „Fusobakterium girans“ irrtümlicherweise zu führen.

H. A. Gins (1942) hingegen hat bei seinem *Spirillum buccale* Koch im Gegensatz zu den anderen Untersuchern vor allem die starke Flexibilität der Keime, die im „Klatschpräparat alle Übergänge von feinen gestreckten Fädchen bis zum geschlossenen Ring“ aufweisen zum Anlaß genommen sie den Spirillen zuzuordnen. Diese Klassifizierung scheint noch willkürlicher wenn man bedenkt, daß die Keime auch nach Gins nie eine regelmäßige Schraubenform aufweisen und unbegeißelt sind. Dies und die darüberhinaus vorhandene Flexibilität spricht eindeutig gegen die Spirillennatur dieser Keimgruppe.

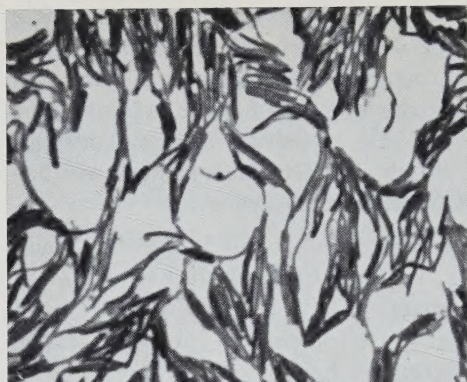


Abb. 1. Klatschpräparat von Blutagaroberfläche. Hier liegt ein fadenförmiger, „schnell kriechender“ Stamm vor. Besonders die Flexibilität der Keime ist gut sichtbar; ferner die Tendenz zur Parallelagerung auf festen Oberflächen. Vergr. 1 : 1000, Fuchsinfärbung.

U. Berger (1956) ist von der Fusobakteriennatur seiner beweglichen Keime so fest überzeugt, daß er eine genaue morphologische Beschreibung der Keime für überflüssig hält, da ja „die typische Morphologie und Struktur der Fusobakterien so charakteristisch und bekannt sind, daß eine Aufzählung dieser Eigenschaften unterbleiben kann.“ Seine beige-fügten Abbildungen lassen aber zusammen mit der beschriebenen Bewegungsform keinen Zweifel aufkommen, daß auch sein „Fusobakterium girans“ mit unseren Keimen identisch ist.

2. Unsere Keime färben sich mit den üblichen Anilinfarbstoffen wie Fuchsin, Methylenblau etc. gut, wenn auch nicht sehr kontrastreich an. Sämtliche Stämme sind nach Gram unfärbbar, auch in sehr jungen Kulturen konnten niemals grampositive Exemplare gefunden werden.

3. Die Gestalt der Keime, wie sie sich bei den üblichen Färbemethoden oder auch bei Dunkelfeldbetrachtung offenbart, zeigt bei den einzelnen Stämmen trotz der sonstigen großen Übereinstimmung eine gewisse Variationsbreite. So ist einerseits bei vielen Stämmen ein mehr fadenförmiges Aussehen vorhanden, wobei die Zellenden verhältnismäßig abgerundet erscheinen (Abb. 1), während bei anderen Stämmen mehr die Spindelform überwiegt, d. h. die Keime sind an beiden Enden zugespitzt und im mittleren Anteil etwas verdickt. (Abb. 2) Im Gesamtbild scheinen die spindeligen, mehr fusobakterienähnlichen Keime kurz, die fadenförmigen Stämme mit abgerundeten Enden sind dagegen zumeist um Einiges länger (Vergl. Abb. 1 und Abb. 2).

Wir konnten bei unseren Stämmen die Feststellung machen, daß zwischen Keimlänge und Fortbewegungsgeschwindigkeit eine gewisse Beziehung besteht. Die längeren, fadenförmigen Keime weisen zumeist ein relativ schnelles Gleitvermögen auf, während die kurzen, spindeligen Stämme nur sehr langsame Ortsveränderungen vornehmen.

Als besonderes Merkmal ist bei den gefärbten Präparaten die große Flexibilität der Keime erkennbar (Abb. 1 u. Abb. 2). Die Weichheit und Biegsamkeit der Keime ist so groß, daß bei bestimmten Präparaten ge-

Abb. 2. Klatschpräparat von Blutagaroberfläche eines spindelförmigen, kurzen Stammes. Es handelt sich um einen „langsamen Kriecher“. Auch bei diesen kurzen Keimen ist die Parallellagerung und die vorhandene Flexibilität gut zu erkennen. Vergr. 1 : 1000, Fuchsinfärbung.

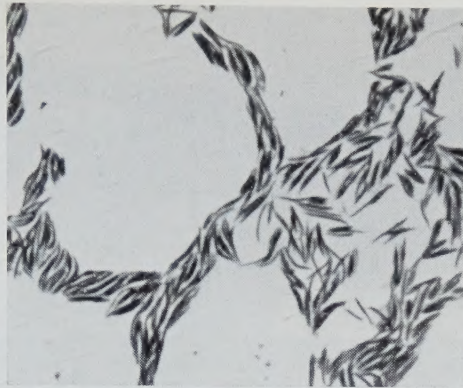
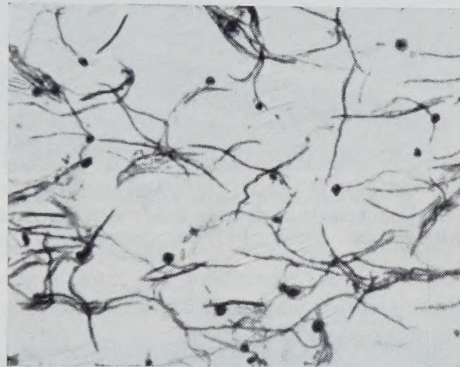


Abb. 3. Die Abbildung zeigt ein Grampräparat eines fadenförmigen Keimes aus einer etwa 7 Tage alten Oberflächenkultur. Deutlich sind die unregelmäßigen Windungen bei den meisten Keimen zu erkennen, die unwillkürlich an Spirochäten denken lassen. Vergr. 1 : 1000, Gramfärbung.



radezu spirochätenartig gewundene Gebilde entstehen können (Abb. 3). Diese Formen waren es, die manche Beobachter getäuscht haben und so Anlaß zu den seltsamsten Vermutungen wurden. So sollten aus *Fusobakterien* Spirochäten entstehen können, (*R. Tunncliff*; *G. Sanarelli*; *Dean und Dean*) oder man hielt die Keime dieser unregelmäßigen Windungen wegen für Spirillen (*Gins*).

4. Die Abmessungen der Keime sind verhältnismäßig variabel. Ihre Länge schwankt zwischen 8 und $3,5 \mu$, die Breite weist mit $0,2-0,3 \mu$ eine größere Konstanz auf. Außerdem treten aber bei allen Stämmen neben den Keimen der Durchschnittslänge auch fadenförmige Gebilde auf, deren Länge diejenigen der normalen Keime bei weitem übertrifft.

5. Der Feinbau der Keime ist bei der Kleinheit des Objektes nur mit Hilfe von elektronenoptischen Aufnahmen genau zu ermitteln. In einer Serie von elektronenmikroskopischen Aufnahmen haben wir uns über die Morphologie und den zellulären Aufbau dieser besonderen Bakteriengruppe einen genauen Einblick verschafft. Die aus der großen Anzahl von Aufnahmen herausgewählten beiden Abbildungen zeigen einmal einen längeren, fadenförmigen Keim (Abb. 4) und zum anderen einen der mehr spindelförmigen, kurzen Varianten (Abb. 5) bei 15 000-facher elektronenoptischer Vergrößerung.

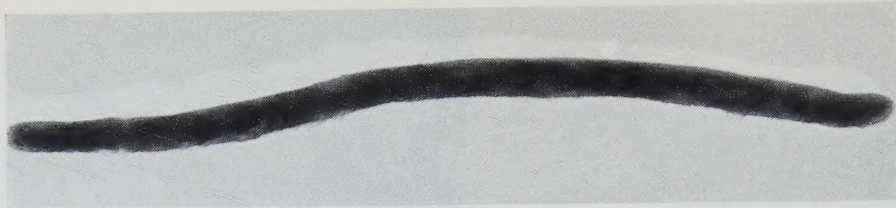


Abb. 4. Elektronenoptische Aufnahme eines fadenförmigen, langen Keimtyps. Das Fehlen von scharfen Randkonturen wird durch das Nichtvorhandensein einer festen Zellmembran bedingt. Vergr. 1 : 15 000, OsO_4 -fixiert, Platin-Iridium bedampft.

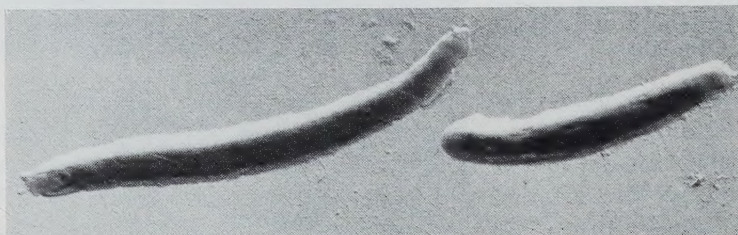


Abb. 5. Elektronenoptische Aufnahme zweier Keime vom Typus der kurzen, spindelförmigen Arten. Auch hier keine scharfen Randkonturen als Ausdruck einer fehlenden Zellmembran. Vergr. 1 : 15 000, OsO_4 -fixiert, Platin-Iridium bedampft.

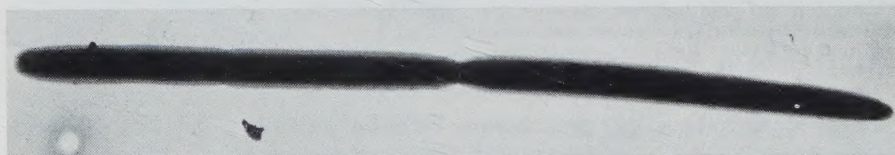


Abb. 6. Elektronenoptische Aufnahme von *Fusobakterium plauti-vincenti* Knorr. Man sieht zum Unterschied zu unseren Keimen die feste Zellmembran, die dem Bakterium eine größere Festigkeit und Randschärfe verleiht. Vergr. 1 : 11 000, OsO_4 -fixiert, Platin-Iridium bedampft.

a) Die Zellmembran: Die in der schon beschriebenen starken Biegsamkeit der Zellen und durch ihre kriechende Fortbewegungsart zum Ausdruck kommende Verformbarkeit ließ die Vermutung aufkommen, daß diese Keime keine richtige Membran wie normale Bakterien haben, sondern daß eine Plasmaverdickung einer dünnen, dehnbaren Zellmembran gleichkommt.

Durch unsere elektronenoptischen Untersuchungen konnten wir diese Vermutung bestätigen. Im Gegensatz zu anderen Bakterien z. B. echten Fusobakterien (Abb. 6) wiesen unsere Keime keine stark abgesetzte Randzone auf, sondern zeigen einen unscharfen, weich anmutenden Rand. Bei Keimen die nicht fixiert auf die Objektblenden gebracht werden, manifestiert sich die Weichheit und Verformbarkeit des Zelleibes in einer wesentlichen Verbreiterung der Keime, was auf ein Abflachen und ein gleichsames Zerfließen der Zellen zurückzuführen ist (Abb. 22 u. 23).

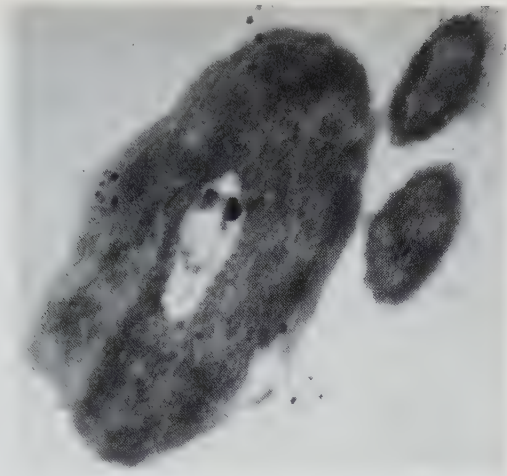


Abb. 7. Ultradünnschnitt durch ein Keimgemisch von unseren Keimen und *Bac. cereus*. Beim quergeschnittenen *Bac. cereus* ist die Membran als abgegrenzte, homogene Zone zu erkennen, unsere Keime zeigen nur eine unscharf abgegrenzte Verdichtungszone mit rundlichen Erhebungen an der Außenfläche (quergeschnittene „Raupebänder“). Vergr. 1 : 60 000, Einbettung in Plexiglas.

Eine klare Entscheidung über das Vorliegen einer Membran bei unseren Keimen konnten wir jedoch erst mit Hilfe von Ultradünnschnitten in Plexiglas eingebetteter Keime fällen. Dabei wurden, des Vergleiches halber unsere Keime mit *Bac. cereus* vermischt. In gut getroffenen Querschnittsbildern war die Membran bei *Bac. cereus* als kräftige, homogene Schicht vom Protoplasma scharf abgegrenzt zu erkennen. Bei unseren Keimen dagegen war eine scharf abgegrenzte Außenzone, die als Zellmembran gedeutet werden könnte nicht nachweisbar. Sichtbar ist lediglich eine vom Plasma unscharf abgegrenzte Verdichtungszone. (Abb. 7) Unsere Keime besitzen demnach keine Zellmembran im üblichen Sinne, sondern es liegt lediglich eine Verdichtungszone vor, die für die Erhaltung der Gestalt verantwortlich ist. Die Keime sind also praktisch „nackt“ und deshalb gegenüber äußeren Einflüssen chemischer oder physikalischer Art besonders hinfällig.

Die große Hinfälligkeit dokumentiert sich auch in der Gallelöslichkeit unserer Keime: Bei Zusatz von Na-taurocholicum zu einer gut getrübbten flüssigen Kultur ist bis herab zu einer Konzentration von 2 % innerhalb von 10 Minuten bei Zimmertemperatur eine völlige Klärung der Keimsuspension zu beobachten.

Ein weiteres Phänomen, das wir ebenfalls auf das Fehlen einer Membran zurückführen ist die sog. Karbolfuchsinlöslichkeit unserer Keime: Färbt man ein üblicherweise fixiertes Präparat unserer Keime durch Einlegen in Karbolfuchsinlösung, wie sie bei der Färbung nach *Ziehl-Neelson* Verwendung findet bei Zimmertemperatur etwa drei Minuten lang, entfärbt dann mit 3 % Salzsäurealkohol und färbt mit normaler Fuchsingebrauchslösung nach, so zeigen alle unsere Keime starke Auflösungserscheinungen, d.h. sie sind im Vergleich zu einem nicht vorbehandeltem Fuchsinpräparat nur noch schemenhaft zu erkennen. Gewöhnliche Bakterien, z.B. *Fusobakterien* sind

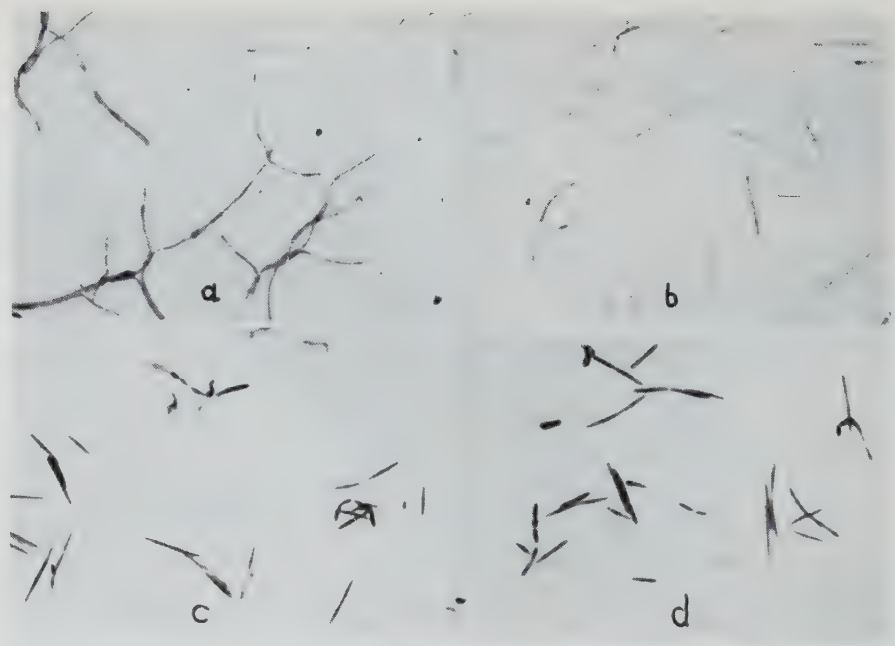


Abb. 8. Die Abbildungsreihe zeigt die Karbolempfindlichkeit unserer Keime im Unterschied zu gewöhnlichen Fusobakterien. Vergr. 1 : 1000.

a) gewöhnliche Fuchsinfärbung unserer Keime. Sie sind, wenn auch kontrastschwach, durchgehend gefärbt. b) Fuchsinfärbung nach Karbolfuchsinbehandlung: Hier sind unsere Keime in großen Bezirken des Zelleibes nicht angefärbt. c) gewöhnliche Fuchsinfärbung: Die Fusobakterien sind gut angefärbt. d) Fuchsinfärbung nach Karbolfuchsinbehandlung: Es besteht kein Unterschied gegenüber dem nichtbehandelten Präparat.

dagegen auch nach der Karbolfuchsinbehandlung unverändert gut anfärbbar (Abb. 8).

In Versuchen konnten wir feststellen, daß weder die Karbolsäure allein, noch das Fuchsin oder der Salzsäurealkohol für diese Bakterienlyse verantwortlich sind. Offenbar ist es speziell das Karbolfuchsin als chemische Verbindung das diese Wirkung entfaltet.

Das Verhalten gegenüber Karbolfuchsin, das wir außer bei unseren Keimen nur noch bei einem von uns reingezüchteten Spirillenstamm und bei Spirochäten gefunden haben, ist unter Umständen ein wertvolles Hilfsmittel bei der Abgrenzung unserer Keime von echten Fusobakterien, nämlich dann, wenn die Keime auf festen Nährböden — was zuweilen vorkommt — zunächst keine oder nur unmerklich geringe Beweglichkeit aufweisen und somit die Unterscheidung von Fusobakterien schwierig wird.

b) Geißelnachweis: Eine große Anzahl elektronenoptischer Aufnahmen hat auch bei der schonendsten Präparationstechnik bei keinem unserer Stämme das Vorhandensein von Geißeln erkennen lassen. Für

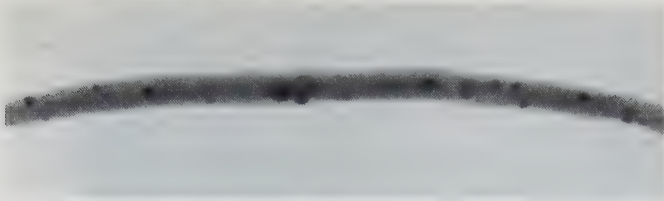


Abb. 9. Elektronenoptische Aufnahme eines unserer Keime. Deutlich sind die Nucleoide in unregelmäßiger Verteilung und Größe erkennbar. Vergr. 1 : 13 000, unfixiert und unbedampft!

die dennoch vorhandene Beweglichkeit muß demnach ein anderer Fortbewegungsmechanismus vorhanden sein. Darüber und über die elektronenoptisch nachgewiesenen Bewegungsorgane wird in Kapitel IV ausführlich berichtet werden, da es sich um einen bisher in der Mikrobiologie unbekannten Bewegungsapparat handelt.

c) Die Kernfrage: Die Frage nach dem Vorhandensein eines Zellkernes bei Bakterien ist mittlerweile dahingehend geklärt, daß man keinen Zellkern im üblichen Sinne wie bei Tier- und Pflanzenzellen annimmt. Jedoch steht eindeutig fest, daß Zellkernäquivalente bei allen Bakterien vorhanden sind. Diese sog. Nucleoide oder Karyoide, die praktisch nur aus Desoxyribonucleinsäuren (DNS) bestehen, lassen sich färberisch infolge der bei Bakterien in diffuser Verteilung über den ganzen Zelleib vorliegenden Ribonucleinsäuren (RNS) nicht ohne weiteres nachweisen. Erst die sog. Nuclealfärbung nach *Feulgen gestattete* durch Eliminierung der die Nucleoide maskierenden RNS die in bestimmten Lebensphasen bei Bakterien besonders deutlich hervortretenden Kernäquivalente sicher nachzuweisen.

Auch unsere Keime zeigten bei der *Feulgenreaktion* solche Kernäquivalente in mehr oder minder stärkerem Ausmaß und Verteilung.

Sicher und eindeutig konnten wir jedoch die mit der *Feulgenreaktion* nachgewiesenen Nucleoide in elektronenoptischen Aufnahmen von unfixierten und unbedampften Präparaten belegen (Abb. 9, 10, 11). Aus den Abbildungen ist das Vorhandensein von Zellkernäquivalenten mit aller Deutlichkeit zu entnehmen.

Entsprechend den einzelnen Entwicklungs- und Altersstufen sind sie allerdings nur in zeitlich günstig ausgewählten Präparaten gut zu erkennen. Dabei zeigen sich Unterschiede in Anzahl und Größe bei den Nucleoiden. Die Kernäquivalente erscheinen in gewissen Lebensphasen mehr diffus, in viele kleine Nucleoide unterteilt (Abb. 9).

Zu bestimmten Zeiten tritt dann aber eine Konzentrierung der Chromatinsubstanzen ein, die Nucleoide werden an Zahl geringer, an Umfang nehmen sie jedoch zu (Abb. 10), sodaß schließlich in gewissen Wachstumsphasen der Eindruck richtiger, schön ausgeprägter Zellkerne entsteht (Abb. 11).

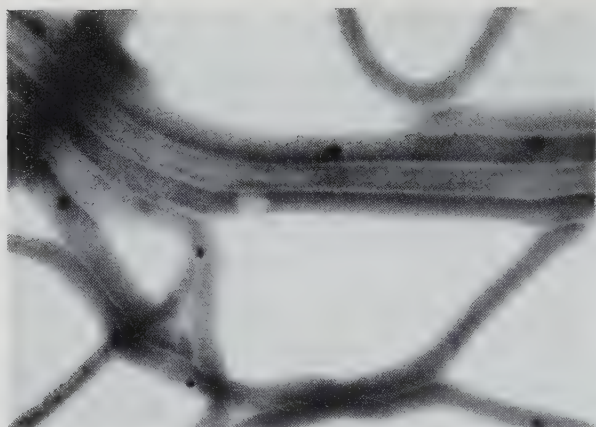


Abb. 10. Derselbe Stamm wie Abb. 9, jedoch in einem weiteren Kernentwicklungsstadium. Die Nucleoide sind an Zahl vermindert, an Größe haben sie zugenommen. Vergr. 1 : 13 000, unfixiert und unbedampft!

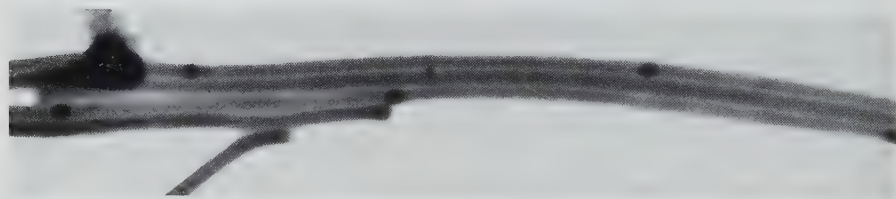


Abb. 11. Letzte Phase der Kernentwicklung. Es haben sich richtiggehende „Kerne“ entwickelt. Vergr. 1 : 11 000, unfixiert und unbedampft.

III. Kulturelle Eigenschaften und biochemische Leistungen unserer Keime

1. Unsere Stämme wurden alle auf 10 % Hammelblutagarplatten nach dem Fortnerverfahren isoliert und fortgezüchtet.

Die auf der Blutagaroberfläche sich ausbildende Kolonieform zeigte bei allen unseren Stämmen eine sehr große Übereinstimmung, so daß es zumeist unmöglich war am Koloniebild verschiedene Stämme zu unterscheiden. Die Oberflächenkolonien sind flach, feucht glänzend, leicht konfluierend, durch Speicherung von Hämoglobinabbauprodukten meist rötlich schillernd (bei Sauerstoffzutritt Umschlag ins Grüne!) und sind sehr oft von einem hauchartigen Schwärmsaum umgeben. (Abb. 12 und Abb. 13) Beim Zusammenstreichen mit der Öse ergeben sich weiche, schleimige Massen, die eine gewisse Eigenfärbung erkennen lassen, wobei alle Übergänge von grau-gelb bis zum reinen Gelb vorhanden sind. Bei einigen Stämmen machte sich vor allem am Anfang der Kultivierung die unverkennbare Tendenz bemerkbar in die Agaroberfläche einzuwachsen. Das Schwärmvermögen auf der Blutagaroberfläche hängt vom Feuchtigkeitsgehalt der Platten ab. Bei wenig getrockneten und besonders bei frisch gegossenen Platten kann der hauchartige Schwärmsaum einen großen Umfang annehmen, wenngleich das Überschwärmen der ganzen Platte von uns niemals beobachtet wurde. Ältere und gut getrocknete Platten können dagegen die Ausbil-

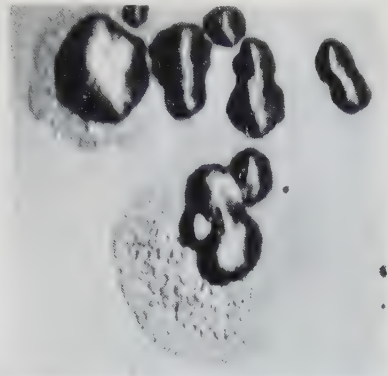


Abb. 12. Typische Einzelkolonien auf Blutagaroberfläche. Man beachte die schleimig-glänzenden Kolonien mit dem umgebenden Schwärmsaum. Vergr. 9fach.



Abb. 13. Strichkultur auf Blutagaroberfläche, wie sie bei üblicher kräftiger Beimpfung mit der Öse nach einigen Tagen sich charakteristischer Weise ausbildet. Vergr. 7fach.

dung eines Schwärmsaumes ganz verhindern, die Kolonien bekommen dann eine mehr rundliches, erhabenes Aussehen.

Da die Serophilie bei *Fusobakterien* nach *Knorr* eine unabdingbare Eigenschaft darstellt, haben wir zunächst alle unsere Züchtungen auf Blutagarplatten oder serumhaltigen Nährböden vorgenommen. Erst im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen stellte sich heraus, daß unsere Keime auch auf gewöhnlichen Fleischwasseragarplatten zu wachsen vermögen. Die Kolonieform und Üppigkeit der Kultur unterscheidet sich dabei in keiner Weise von dem Wachstum auf Blutagarplatten. Bei den durchsichtigen und fast farblosen Fleischwasseragarplatten ist die Eigenfarbe der Kolonien besonders deutlich zu erkennen. Sie variiert von farblos-gelbstichig bis zur eindeutig gelben Färbung. Die Stämme waren auf Fleischwasseragarplatten beliebig lang weiter züchtbar. Daraus ergibt sich, daß unsere Keime nicht serophil sind und sich damit grundsätzlich von den *Fusobakterien* unterscheiden, die zum Wachstum immer zumindestens Spuren von nativen Serum benötigen.

Auch das Wachstum in hoher Schicht einer Serumagarschüttelkultur war bei allen Stämmen ziemlich einheitlich: Nach Zusatz von 10 %



Abb. 14. Flüssige Kultur in Leber-Leberbrühe mit Serumzusatz: Die gleichmäßige, nicht allzu starke Trübung ist im Vergleich zu einem unbewachsenen Röhrchen (links!) gut zu erkennen.

Rinderserum zu erweichtem 1 % Fleischwasseragar (15 ml) wurde ein Tropfen einer verdünnten Keimsuspension zugefügt und nach guter Durchmischung in hoher Schicht erstarren lassen. Nach etwa 5 Tagen entstanden kleine scheibenförmige Einzelkolonien, die bei mittlerer Vergrößerung aus unregelmäßigen kleinsten Körnchen zu bestehen schienen. Das Wachstum der Einzelkolonien erfolgte wegen der strikten Anaerobiose unserer Keime nur bis etwa 4 cm von der Agaroberfläche entfernt.

Als flüssigen Nährboden haben wir vorzugsweise Leberbrühe mit 10 % Serumzusatz verwendet. Nach der Beimpfung ist zunächst eine Latenzzeit von 2—3 Tagen vorhanden. Dann erfolgt langsam von unten aufsteigend eine schleierartige Trübung der Nährbodenflüssigkeit, die sich in einigen Tagen bis zur Oberfläche ausbreitet, so daß nach einer Bebrütungszeit von 5—6 Tagen das ganze Röhrchen eine homogene, nicht sehr starke Trübung aufweist (Abb. 14).

Ein Bodensatz bildet sich langsam im Verlaufe des Wachstums, allerdings ist er sehr gering und nimmt erst in alten Kulturen infolge Sedimentation von toten Keimen merklich zu.

Auch bei flüssigen Nährböden ist Serumzusatz nicht erforderlich, wenngleich er eine wesentliche Verbesserung des Wachstums mit sich bringt.

Die im nächsten Kapitel näher beschriebene gleitende Beweglichkeit der Keime ist zuweilen sehr nährbodenabhängig. Bei Keimen von festen Nährböden ist die kriechende Beweglichkeit zumeist geringer oder überhaupt nicht vorhanden, während Keime aus flüssigen Nährböden diese typischen Bewegungen im allgemeinen wesentlich besser und stärker aufweisen. Diese an sich paradoxe Tatsache mag darauf beruhen, daß der bei Keimen aus festen Oberflächenkolonien durch die Betrachtung im Nativpräparat notwendige rasche Milieuwechsel von fest auf flüssig schockartig die Beweglichkeit zum Stillstand bringt.

Auf anorganischen Nährböden waren unsere Keime bisher nicht zum Wachstum zu bringen: Wir versuchten unsere Keime auf einem anorganischen Nährboden zu kultivieren wie er mit Zellulosezusatz zur

Züchtung von Myxobakterien Verwendung findet. Seine Zusammensetzung war: NaCl: 0,1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$: 0,05 % K_2HPO_4 : 0,07 % KH_2PO_4 : 0,03 % MgSO_4 : 0,02 % CaCl_2 : 0,001 %; FeCl_3 : 0,001 % und 1 % Agar in Leitungswasser.

Die Keime waren auch nicht angegangen als wir Zellulose oder Stärke als organische Kohlenstoffquellen zugefügt hatten.

Daraus muß man schließen, daß unsere Keime nicht autotroph, sondern heterotropher Natur sind.

Auch auf Blutagarplatten war den Keimen bei gutem Wachstum eine Zellulosespaltung (Aufgelegtes Filtrierpapier) nicht möglich. Dies ist nicht verwunderlich, denn das bei aeroben Myxobakterien konstant vorhandene Zellulosespaltungsvermögen beruht auf oxydativen Vorgängen, zu denen anaerobe Keime natürlich nicht in der Lage sind.

2. Physikalische Umweltsbedingungen

a) Temperatur: Wir haben unsere Stämme im allgemeinen bei 37° C kultiviert, was naheliegend war, da sie ja der menschlichen Mundhöhle entstammen. Bei 22° C war nach gewöhnlicher Verimpfung sowohl in flüssigen als auch auf festen Nährböden Wachstum nicht feststellbar. Allerdings stellte sich heraus, daß flüssige Kulturen, welche bei 37° C einige Tage bebrütet worden waren und bereits Wachstum erkennen ließen, auch bei Zimmertemperatur nunmehr ihr Wachstum, wenn auch wesentlich langsamer fortsetzen konnten.

Auch die Beweglichkeit der Keime wird durch Zimmertemperaturen nicht sehr rasch beeinträchtigt, denn wir konnten in Präparaten, die bis zu 24 Stunden im Nativpräparat unterm Mikroskop gehalten worden waren, immer noch Kriechbewegungen feststellen.

Bei Temperaturen über 37° C, bis 42° C, war noch gutes Wachstum in festen und flüssigen Kulturen vorhanden. Temperaturen darüber wurden bis 46° C über eine Stunde lang von den Keimen ertragen, ohne daß ihre Vermehrungsfähigkeit Schaden gelitten hätte. Bei 50° C werden die Keime in spätestens 15 Minuten abgetötet.

b) Verhalten gegen Luftsauerstoff

Aus der geschilderten Isolierungsmethodik, die ja ursprünglich auf die Gewinnung von Fusobakterienstämmen abzielte ergibt sich, daß unsere Keime nur bei Sauerstoffabwesenheit zu wachsen in der Lage sind. Diese Keime sind strenge, obligate Anaerobier, eine Tatsache, die bei der später vorzunehmenden Klassifizierung von Bedeutung ist.

c) UV-Empfindlichkeit

Bei Versuchen, die Bewegungsform der Keime mit Hilfe der UV-Mikroskopie zu analysieren wurden wir auf eine ungewöhnliche, starke UV-Empfindlichkeit der Keime aufmerksam: Bei Einwir-

kungen von monochromatischer UV-Strahlung stellte sich heraus, daß die Keime geradezu schlagartig ihre Kriechbewegungen einstellten. Unter mikroskopischer Kontrolle konnten wir ermitteln, daß bei der Wellenlänge $260\text{ m}\mu$ die Keime bereits nach 3—5 Sekunden(!) bewegungslos geworden waren, bei $380\text{ m}\mu$ genügten 20—25 Sekunden um die Keime zum Stillstand zu bringen. Ob die Bakterien sofort tot sind, oder ob nur ihr Bewegungsapparat irreversibel geschädigt wird konnten wir bis jetzt noch nicht untersuchen, jedoch das Nichtvorhandensein einer festen Zellmembran spricht für die erste Ansicht.

3. Biochemische Reaktionen:

Es sollen hier nur die allgemein üblichen Fermentuntersuchungen durchgeführt werden. Ins Einzelne gehende Stoffwechseluntersuchungen dieser Bakteriengruppe müssen einer weiteren Arbeit vorbehalten bleiben.

Zunächst sei vorangestellt, daß alle unsere Stämme sowohl auf festen wie auch in flüssigen Nährböden mit und ohne Serumzusatz nie irgendwelche Geruchs- oder Gestanksbildung wahrnehmen ließen.

a) Kohlehydratspaltungsvermögen:

Zur Prüfung des Kohlehydratspaltungsvermögens wurde folgende Nährbodenkombination verwendet: Verdauungsbrühe nach *Hottinger* + 0,5 % Zusatz der zu testenden Zuckerart, eingestellt auf $\text{pH} = 7,0$, zu je drei ml in mit *Durham*-Gärröhrchen beschickte Röhrchen abgefüllt und fraktioniert sterilisiert. Dann wurden unter sterilen Kautelen je Röhrchen 0,2 ml steriles Rinderserum zugefügt und nach erfolgter Sterilitätskontrolle die Röhrchen beimpft. Die Bebrütung erfolgte 7 Tage lang im Anaerobentopf nach *Knorr* bei 37°C , danach wurde die Bestimmung des End-pH-Wertes elektrometrisch mit dem „Jonotest“-Gerät der Fa. Lautenschläger vorgenommen.

Für jede Zuckerart wurde ein unbeimpftes Röhrchen zur pH-Kontrolle nach der Bebrütungszeit mitgeführt. Der Serumzusatz erwies sich als notwendig um gutes Wachstum der Stämme zu gewährleisten.

Geprüft wurden: Dextrose, Lactose, Maltose, Saccharose, Mannit und Inulin.

Die Ablesung nach 7 Tagen zeigt folgendes Resultat:

a) Bei allen Stämmen war bei allen geprüften Zuckern Gasbildung nicht nachweisbar gewesen.

b) Über Art und Ausmaß der Säurebildung gibt folgende Tabelle Aufschluß. (Kontrollwert: $\text{pH} = 7,00$)

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, daß das Zuckervergärungsvermögen bei unseren Keimen sehr schwach ausgeprägt ist. Die maximal aufgetretene Säuerung lag etwas unter $\text{pH} 6$.

Stämme	Dextrose	Lactose	Maltose	Sacharose	Mannit	Inulin
X 1	6,60	6,88	6,64	6,57	6,70	6,94
X 2	6,65	6,45	7,00	7,00	6,70	6,90
X 3	6,00	6,80	6,12	5,90	6,80	6,83
X 5	6,70	6,94	6,25	6,15	6,90	6,80
X 6	7,00	6,88	6,98	7,00	7,00	6,90
X 7	6,10	6,65	6,30	6,85	6,95	6,83
X 8	7,00	6,85	6,93	5,95	7,00	6,82
X 9	6,55	6,35	6,53	6,83	6,91	6,95
X 10	6,73	6,88	6,58	6,55	6,83	6,85
X 11	6,45	6,43	7,00	6,00	6,00	6,78

Die Zahlen geben den End-pH-Wert nach 7 tägiger Bebrütung an, der Fett-druck bedeutet sichere Säuerung.

Diese schwachen und überdies nicht einheitlichen pH-Änderungen sind für eine Identifizierung oder gar Klassifizierung unserer Keime nicht geeignet.

b) Indolbildung:

Dazu wurden Röhrchen mit 3 ml Trypsinbouillon und 0,2 ml Rinderserumzusatz verwendet. Nach 7 tägiger Bebrütung im Anaerobentopf wurde mit dem *Ehrlichschen* Indolreagens auf Indolgehalt geprüft.

Bei allen unseren Stämmen war das Indolbildungsvermögen negativ.

c) Gelatinespaltung:

Die Stämme wurden in Gelatineröhrchen (5ml Gelatine + 0,3 ml Rinderserum) geimpft und bei 37° C im Anaerobentopf 7 Tage lang bebrütet.

Auch hierbei zeigten die Keime keinerlei proteolytische Eigenschaften.

d) H₂S-Bildung:

Dazu wurde Bleiazetatagar mit 0,3 ml Serumzusatz in Röhrchen (5 ml) gegossen und nach dem Erstarren mit den einzelnen Stämmen im hohen Stich beimpft. Die Bebrütung erfolgte wieder bei 37° C im Anaerobentopf für die Dauer von 7 Tagen. Alle unsere Stämme waren nicht in der Lage H₂S zu bilden.

Die zusammenfassende Würdigung der hier geprüften biochemischen Leistungen offenbart für diese Bakterienart eine ausgesprochene Fermentschwäche. Es sind weder proteolytische Eigenschaften vorhanden, noch sind die geringen sacharolytischen Wirkungen von wesentlicher Bedeutung.

IV. Bewegungsform und Bewegungsmechanismus der Keime

1. Unsere Keime sind durch eine ungewöhnliche, im Bereich der Mikrobiologie einzigartige Bewegungsform gekennzeichnet. Aus den verhältnismäßig spärlichen Literaturangaben lassen sich zwei Bewegungstypen herausfinden. Einmal das eigenartige, für die Fortbewegung scheinbar sinnlose Vorhandensein von zuckenden, schwingenden oder mehr drehenden Bewegungsarten, wobei das eine Keimende an einer Unterlage fixiert ist, während der übrige Teil des Stäbchens oscillierende oder rotierende Bewegungen ausführt. (S. Costa, 1909; T. Shmamine, 1912; Malek und Malková, 1939; Prévot, 1940; MacDonald, 1953; Berger, 1956;) — Ähnliches soll übrigens auch bei Wasserbakterien vorkommen. Diese Bakterien besitzen an einem Ende einen Stiel, womit sie sich an festen Unterlagen anheften und tragen den Namen *Caulobacter*. (Henrici und Johnson, 1935) — Die eigentliche Translationsbewegung durch Kriechen auf einer Unterlage wurde unseres Wissens nur zuweilen von Prévot und von MacDonald beobachtet.

Untersuchungen dieser Bewegungsformen besonders in Hinblick auf den zugrunde liegenden Bewegungsmechanismus liegen bisher nicht vor. Gesichert erschien nur, daß die Bewegungen nicht von Geißeln bewirkt werden.

Während Prévot mit den üblichen Geißelfärbungen keinen Erfolg hatte und zu dem Schluß kam, daß Geißeln entweder nicht vorhanden seien oder aus einem besonderen, nicht färbbaren Material bestehen müßten, konnten MacDonald und auch Berger mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen die Geißellosigkeit dieser Keime eindeutig belegen.

2. Die im folgendem beschriebenen Bewegungsformen sind natürlich nicht voneinander getrennt oder als prinzipiell verschieden voneinander zu betrachten. Sie sind vielmehr alle Ausdruck einer sinnvollen Möglichkeit zur Fortbewegung und lassen sich durch einen einheitlichen Bewegungsmechanismus erklären.

a) Ortsbewegung durch Kriechen

Auf fester Unterlage bewegen sich die Keime in einer stetigen gleitenden Bewegung, die zuweilen durch geringe schlängelnde Formveränderungen begleitet wird. Bei längeren Fäden können geradezu schlangenartige Verbiegungen auftreten, besonders wenn solche Gebilde mit dem vorangehenden Teil auf ein Hindernis auftreffen. Die Gleitbewegung wird in Abständen unterbrochen durch ruckartige Verbiegungen des vorangehenden oder des rückwärtigen Keimabschnittes, wobei im ersteren Fall eine Veränderung der Bewegungsrichtung erfolgt. Im Verlauf der Kriechbewegungen tritt eine enorme Flexibilität der Keime deutlich zu Tage.

Die Geschwindigkeit der Gleitbewegungen variiert bei den Keimen und Stämmen. Als maximale Geschwindigkeit konnten wir etwa $1 \mu/\text{sec}$ ermitteln, während besonders langsame Stämme nur etwa $0,04 \mu/\text{sec}$ zurücklegen.

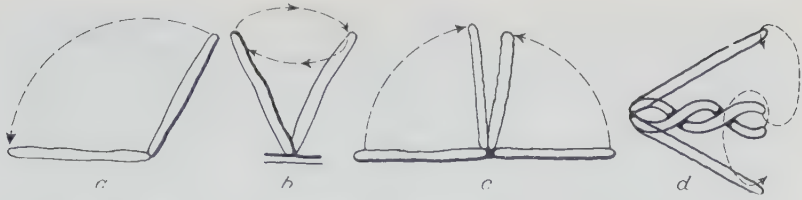


Abb. 15. Die Skizze zeigt die verschiedenen Möglichkeiten der Rotationsbewegungen (siehe Text).

Die Kriechgeschwindigkeit ist naturgemäß gegenüber der Fortbewegungsgeschwindigkeit, die begeißelte Bakterien in Flüssigkeiten entfalten können, wesentlich geringer. So können beispielsweise Typhusbakterien in warmer Nährbrühe eine Geschwindigkeit von $18 \mu/\text{sec}$ (R. Müller) erreichen, manche Spirillen bewegen sich sogar mit $100 \mu/\text{sec}$ vorwärts. (A. Rippel-Baldes)

Bedeutsam ist ferner, daß die Bewegungsrichtung bei den einzelnen Keimen immer die gleiche ist. Diese Bakterien besitzen also ein Vorne und ein Hinten! Rückwärtsbewegung kommt nur als ein kurzes Zurückstoßen mit daran anschließender Vorwärtsbewegung vor.

b) Rotationsbewegungen

Diese zweite Bewegungsform ist häufig als Unterbrechung der Vorwärtsbewegung zu beobachten. Der Vorgang erfolgt rasch, geradezu peitschenartig! Dabei bleibt das hintere Keimende an der Unterlage fixiert, während der übrige Teil des Stäbchens, das dabei ziemlich starr erscheint, mit großer Geschwindigkeit einen Kreisbogen von mehr oder minder großer Ausdehnung beschreibt (Abb. 15 a). Darauf wird meistens in einer neuen Richtung die Gleitbewegung fortgesetzt.

Bei relativ dicken Flüssigkeitsschichten kann es auch vorkommen, daß ein Keim sich senkrecht stellt und bei fixiertem Hinterende mit dem übrigen Teil kegelförmige Rotationsbewegungen ausführt (Abb. 15 b). Vergleiche das Verhalten von *Caulobacter*!

Zwei zusammenhängende Stäbchen bewegen sich häufig um die Verbindungsstelle in raschen Klappbewegungen (Abb. 15 c) oder sie umschlingen einander spiralig, um dann plötzlich wieder auseinander zu schnellen (Abb. 15 d).

Die gleitende Bewegung und die Rotation um einen fixierten Pol sind nun keine verschiedenen Bewegungsformen, sondern sind Komponenten einer einzigen sinnvollen Fortbewegungsart. Das sich kriechend fortbewegende Stäbchen wird durch die rotierende Schlagbewegung in die Lage versetzt, ruckartig die Kriechrichtung in jedem gewünschten Ausmaß zu verändern. Alle Rotationsbewegungen und sonstigen zuckenden Bewegungserscheinungen ohne Verbindung mit der Kriechbewegung, wie sie von früheren Autoren berichtet wurden, sind nur unphysiologische Erscheinungsformen unter für die Keime ungünstigen Milieubedingungen.

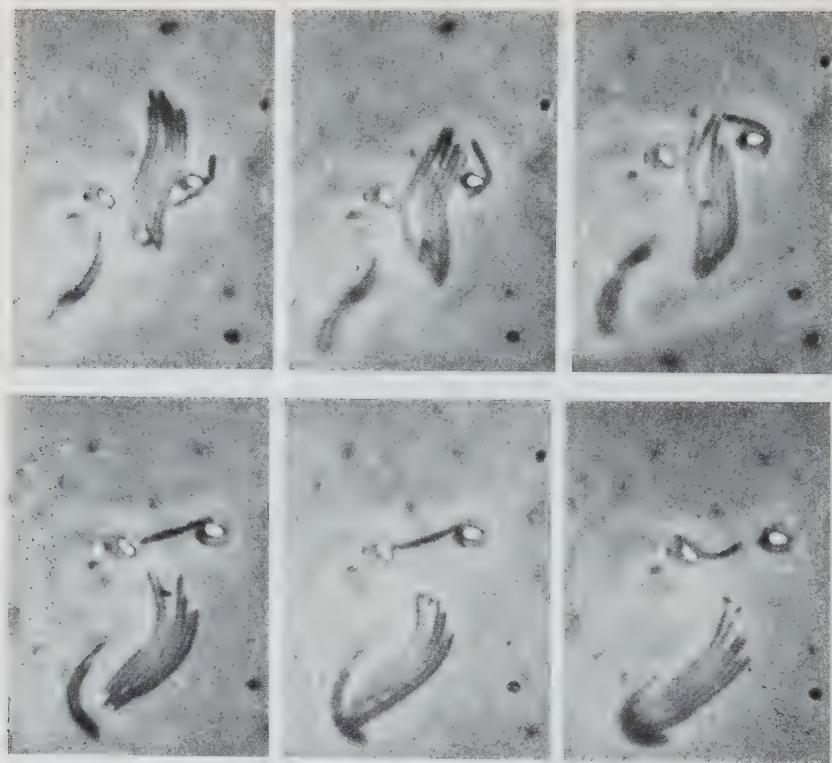


Abb. 16. Filmaufnahmen einer Gruppe unserer Bakterien auf Glasoberfläche kriechend. Die Keime bewegen sich in typischen Formationen, parallel angeordnet, mit etwa gleicher Geschwindigkeit vorwärts. Gegen Ende der Aufnahmeserie trifft die Keimformation auf eine andere Gruppe von Keimen. Man beobachtet besonders die sich dabei manifestierende Flexibilität der Keime. Die einzelnen Aufnahmephasen sind im zeitlichen Abstand von etwa 5 Sekunden aufgenommen. Der Film wurde mit der Mikrokina-Apparatur der Fa. Zeiß hergestellt. Vergr. 1 : 1750.

c) Abgesehen von diesen Bewegungsformen auf flüssigkeitsbedeckten Unterlagen konnten wir noch die Feststellung machen, daß die Keime auch auf festen Oberflächen ohne bedeckende Flüssigkeitsschicht sehr eindrucksvolle, kurzfristige Kriechbewegungen vollführen können. Betrachtet man im falschen hängenden Tropfen diejenigen Abschnitte in denen mit Absicht oder durch Zufall Luftblasen entstanden sind, so sieht man dort häufig an der relativ trockenen Glasoberfläche die Keime in typischen Formationen zu dreien, viere oder noch mehr, parallel angeordnet mit etwa der gleichen Geschwindigkeit sich kriechend fortbewegen. (Abb. 16) Diese gemeinsame Fortbewegung in Keimverbänden ist bei Mikroben einmalig und erleichtert die später vorzunehmende Klassifizierung der Keime.

3. Als nächstes soll nun die Frage nach den Bewegungsursachen untersucht werden. In Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchern (*Prévot, MacDonald, Berger*) haben wir in einer großen

Anzahl elektronenoptischer Aufnahmen die völlige Geißellosigkeit der Bakterien bestätigt.

Es verbleibt für die Fortbewegung demnach nur ein bisher nicht geklärter Kriech- oder Gleitvorgang, der übrigens auch bei einer Anzahl anderer niedriger pflanzlicher Organismen zu finden ist. So schreibt *R. Jarosch* (1958): „Die gleitenden, oft auch als „Kriechbewegungen“ bezeichneten Ortsveränderungen verschiedener niedriger Organismen und ihre physiologische Bedeutung bilden schon seit mehreren Jahrzehnten ein umstrittenes Problem. Charakteristisch für diese Bewegungen, die nur auf festen Unterlagen bzw. Oberflächenhäutchen bei kleinen Formen, möglich sind, ist das Fehlen von Formveränderungen sowie von sichtbaren Bewegungsorganen. Folgende Organismen zeigen diese Bewegungsart: *Euglena*, *Gregarina*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Chlamydo*bakterien, wie *Beggiatoa*, *Thiothrix* und *Leucothrix*, ferner *Myxobakterien*, *Spirochaeten*, pennate *Diatomeen*, Schwärmzellen von Rotalgen und sehr unbeholfen *Desmidiaceen*, besonders *Closterium*.“ Dabei kann es sich bei diesen Bewegungen entweder um einfaches Gleiten handeln, oder sie können mit einer Rotation um die Längsachse verbunden sein.“ Dieser letztere Bewegungsvorgang ist besonders bei den *Oscillatorien* zu finden.

Zur Erklärung der geißellosen Fortbewegung haben sich besonders zwei Meinungen herausgebildet. Einerseits soll die Bewegung durch die Stemmwirkung ausgeschiedener und dann quellender Schleimmassen bewirkt werden (*Correns*, 1897; *Kolkwitz*, 1897; *Fechner*, 1915; *Harder*, 1918; *Schmid*, 1918, 1929), andererseits soll das Ablaufen von Kontraktionswellen über den Zelleib hinweg für die Bewegung verantwortlich sein (*Ullrich*, 1926, 1929).

G. Schulz (1955) konnte bei *Oscillatorien* durch Beobachtung typischer Bewegungserscheinungen an der Oberfläche haftender Carminpartikeln nachweisen, daß die schraubenförmige Vorwärtsbewegung dieser Organismen nicht auf Kontraktionswellen beruht, sondern durch Ausscheidung in spiraligen Bahnen auf der Oberfläche verlaufenden Schleimes (!) bewirkt wird. Wie diese Schleimabsonderung vor sich geht wird allerdings nicht beschrieben.

R. Jarosch (1958) kommt bei seiner Besprechung dieser noch unklaren Gleitbewegungen zu der Ansicht, daß die Bewegung nicht durch eine einfache Schleimstemmwirkung hervorgerufen wird, weil bei den relativ großen Geschwindigkeiten vieler dieser Organismen unmöglich soviel Schleim in kurzer Zeit produziert werden kann, sondern daß die Bewegung auf einer Parallelverschiebung einer dünnen Schleimschicht zur Zelloberfläche beruht, wobei der Motor dieser Schleimbewegung in einer extrazellulären fibrillären Protoplasmaströmung zu suchen sei.

An dieser Stelle scheint es auch angebracht auf die Hypothese einzugehen, die *Reiner Müller* über das Wesen der Myxobakterien und ihren Fortbewegungsmechanismus aufgestellt hat. Er faßt die Myxobakterien

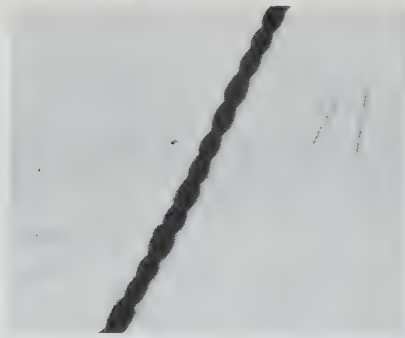


Abb. 17. Zum Vergleich der Größenordnungen zeigt die Aufnahme ein Gemisch von unseren Keimen mit *Anabaena* sp. (Blualge). Vergr. 1 : 1000, Fuchsinfärbung.

als Symbionten verschiedenartiger Keime zusammen, die eingebettet seien in eine Hülle lebenden Schleimes, der als Präviren-Aggregat angesehen wird. Demnach wären für die kriechende Fortbewegung der Myxobakterien nicht die Keime selbst, sondern die sie umgebende, selbständig lebende, schleimige Prävirenmasse verantwortlich. Diese Hypothese entbehrt jedoch, bei aller scharfsinnigen Überlegungskraft die ihr innewohnt, jeder experimenteller Grundlage. Es steht fest, daß die Myxobakterien innerhalb des Bakterienreiches eine gewisse Sonderstellung einnehmen. Sie sind flexibel, besitzen aktives Kontraktionsvermögen und zeigen im Gegensatz zur Meinung R. Müllers besonders deutliche Kernäquivalente. Die sie umgebende „Schleimschicht“ ist nach unseren Untersuchungen tatsächlich in Bewegung und vermittelt somit die gleitende Fortbewegung dieser Keime. Es besteht jedoch kein Anhaltspunkt sie als selbständige Prävirenmasse zu betrachten mit der das Myxobakterium in Form einer Symbiose zusammenlebt.

Bei den Untersuchungen über den Bewegungsmechanismus unserer Keime brachte naturgemäß die verminderte Größenordnung, die hierbei im Vergleich zu Oscillatorien und den übrigen einschlägigen Organismen praktisch um eine Zehnerpotenz nach unten verschoben ist, eine erhebliche Erschwerung der Lösung dieser Probleme mit sich. Während wir bei den Oscillatorien (Blualgen) eine Zellbreite von 2—3 μ antreffen, sind unsere Keime mit 0,3 μ Breite und etwa 4—8 μ Länge doch von wesentlich geringerer Abmessung. Die Abbildung 17 veranschaulicht diesen Unterschied der Größenordnungen zwischen unseren Keimen und einer *Anabaena*-Alge.

Als erstes war die naheliegende Frage zu prüfen, ob die Kriechbewegung nicht durch das Ablaufen von Kontraktionswellen über den Zelleib des Keimes hinweg zu erklären wäre. Damit würde ein Bewegungsmechanismus vorliegen, wie er im Tierreich z. B. bei Würmern recht häufig anzutreffen ist. Bei Betrachtung des kriechenden Keimes im Mikroskop mit polarisiertem Licht konnten jedoch keine wellenförmigen optischen Veränderungen im Bakterienkörper festgestellt werden, die für das Ablaufen einer Kontraktionswelle und der damit verbundenen Dichteänderung sprechen würden.

Auch die zweite Möglichkeit, den Nachweis einer solchen Kriechbewegung durch die dabei auftretenden rhythmischen Verkürzungen und Verlängerungen des Keimes zu erbringen, schlug fehl. Längemessungen die an Hand von Filmaufnahmen* kriechender Keime vorgenommen wurden ergaben, daß während der Fortbewegung die Länge der Stäbchen nicht nachweisbar verändert wird. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß die Fortbewegung durch das Auftreten von Kontraktionswellen nicht zu erklären ist.

Dann bleibt als Bewegungsmechanismus für diese Keime nur der gleiche Vorgang übrig, wie er auch bei den schon erwähnten pflanzlichen Organismen vorhanden sein soll, d. h. Schleimausscheidung oder Plasmabewegung an der Keimoberfläche.

Zur Klärung dieser Frage bedienten wir uns der schon erwähnten Methode, Schleimbewegungen an der Oberfläche von Mikroorganismen mittels kleiner Partikel (Tusche) nachzuweisen. Die gut beweglichen Keime wurden in eine stark verdünnte Aufschwemmung von feinsten Tuschepartikeln gebracht und im Dunkelfeld betrachtet. Die sich ergebenden Beobachtungen waren den Befunden von *Schulz* bei Oscillatorien ähnlich. Kleinste Tuscheteilchen, die sich der Keimoberfläche angelagert hatten, waren während der Kriechbewegung in ständiger Bewegung. Die Teilchenbewegung erfolgte dabei sowohl gleichsinnig wie auch gegensinnig zur Fortbewegungsrichtung des Keimes. Dabei war der Weg eines Teilchens zuweilen sehr gut zu verfolgen, so daß man den Eindruck gewinnen konnte, daß die Teilchen den Keim in seiner ganzen Länge überlaufen und dann in der umgekehrten Richtung wieder zurück laufen. Besonders wichtig ist die Tatsache, daß die Tuschepartikel offensichtlich den Keim in Spiraltouren umlaufen.

Daraus muß man schließen, daß während des Kriechvorgangs ein relativ klebriges Material die Keimoberfläche in spiralförmigen Bahnen umläuft.

Bringt man die beweglichen Keime in eine Tuschesuspension von höherer Konzentration und Teilchengröße, so zeigen sie in wenigen Minuten ein charakteristisches Aussehen. Am hinteren Ende der Stäbchen erfolgt eine massive Anlagerung von Tuschepartikeln, so daß die Keime geradezu Keulenform annehmen. Die Anlagerung der Tuscheteilchen ist sehr stabil, denn man kann die angelagerten Teilchen nach Fixation mit Osmiumsäure und mehrmaligem Waschen im Elektronenmikroskop sehr eindrucksvoll demonstrieren (Abb. 18). Das Phänomen der Tuscheanreicherung am hinteren Keimende bestätigt wiederum die Annahme einer spiralförmig rotierenden klebrigen Oberflächenschicht in dem

* Die Filmaufnahmen wurden mit der „Mikrokina“-Einrichtung der Fa. Zeiss/Oberkochen hergestellt.

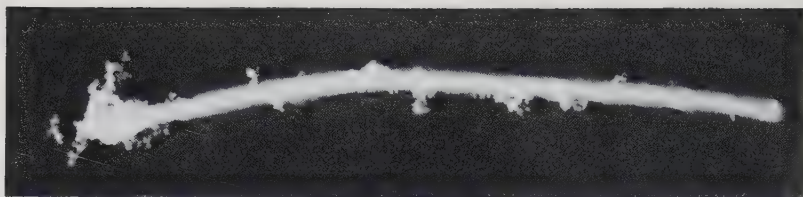


Abb. 18. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Keimes mit massiver Anhäufung von Tuscheteilchen am Hinterende. Man beachte daneben die spirale Oberflächenstruktur des Keimes! Vergr. 1 : 10 000, OsO_4 -fixiert, Platin-Iridium bedampft.

Sinne, daß die allseitig angelagerten Tuschepartikel während des Kriechvorganges nach hinten abgestreift werden und sich dort anlagern.

Wenn die Keime durch eine raupenkettenartige Antriebsvorrichtung, die an der Keimoberfläche in Spiraltouren umläuft, vorwärts bewegt werden, dann müssen sich die Stäbchen während ihrer Gleitbewegung gleichzeitig um ihre Längsachse drehen, d. h. eine schraubenartige Vorwärtsbewegung ausführen. Eine solche Rotation um die Längsachse, die normalerweise bei der Kleinheit des Objektes nicht zu sehen ist, konnte unter besonderen Versuchsbedingungen nachgewiesen werden. Läßt man die Keime in einer etwa 3 % wässrigen Gelatinelösung ihre Gleitbewegungen vollführen, so treten infolge des erhöhten Gleitwiderstandes häufig Verbiegungen am vorderen Teil des Stäbchens auf, woran eindeutig durch das regelmäßige Heraustreten aus der Beobachtungsebene die Rotation um die Längsachse während der Gleitbewegung zu erkennen ist.

Die Keime vollführen demnach eine schraubenartige Vorwärtsbewegung, es liegt somit ein ähnlicher Bewegungsmechanismus vor wie bei den Oscillatorien.

Ein letzter eindeutiger Beweis für das Vorliegen von spiralig angeordneten, klebrigen Bändern, welche durch protoplasmatische Kräfte angetrieben, die schraubenförmige Gleitbewegung bewirken, konnte mit dem Elektronenmikroskop erbracht werden.

In vielen Aufnahmen waren zwar niemals Geißeln nachweisbar, es fanden sich jedoch häufig von den Keimen abstehende perlschnurartige Gebilde, deren Bedeutung zunächst rätselhaft war (Abb. 19 und 20).

Erst nach einer Serie von Aufnahmen wurde uns in Verbindung mit den obigen Befunden klar, daß es sich bei diesen Gebilden um Bänder handelt, die der Keimoberfläche in unversehrtem Zustande spiralig aufliegen und nur bei der Präparation zuweilen abgesprengt werden. Ob diese Bänder in situ schon die „perlschnurartige“ Form besitzen oder ob das Abkugeln erst beim Abgehen von der Keimoberfläche erfolgt, konnte noch nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Bei weniger

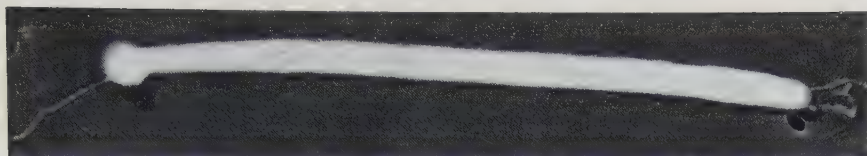


Abb. 19. Elektronenoptische Aufnahme. An beiden Keimenden sind deutlich „perlschnurartige“ Gebilde sichtbar. Es handelt sich dabei um abgerissene „Raupenbänder“. Vergr. 1 : 13 000, OsO_4 -fixiert, Platin-Iridium bedampft.



Abb. 20. Elektronenoptische Aufnahme: Man sieht deutlich bei dem einen Keim die in der Mitte des Zelleibes abgesprungene Schleim„raupe“. Auch an der gegenüberliegenden Seite ist der Zellrand vom Band entblößt, das hier zusammengeschrumpft an einer Stelle liegt. Vergr. 1 : 15 000, OsO_4 -fixiert, Platin-Iridium bedampft.

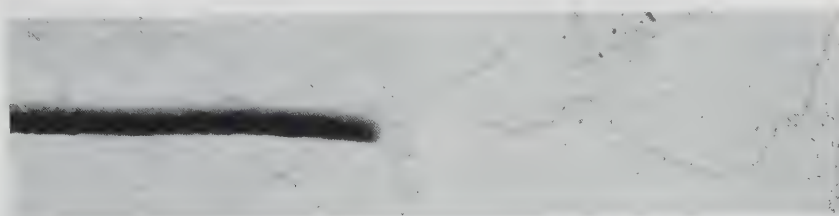


Abb. 21. Elektronenoptische Aufnahme von freien „Raupenbändern“, die bei der Präparation von den Keimen abgegangen sind. Vergr. 1 : 10 000, OsO_4 -fixiert, Platin-Iridium bedampft.

schonender Präparationstechnik scheint dieser „Raupenantrieb“ gänzlich verloren zu gehen, es sind dann aber an der Keimoberfläche deutlich die schraubenartigen Rillen zu erkennen in denen die „Schleimraupen“ ihre Bahn finden (Abb. 18).

Zuweilen waren diese abgesprengten „Raupenbänder“ auch frei neben den Zellen im Gesichtsfeld des Elektronenmikroskops zu finden (Abb. 21).

Bei Anwendung einer ganz besonders schonenden Form der Präparation, wobei die Keime ohne Waschung und Fixation sofort auf die Objektblenden gebracht worden waren, gelang es uns dann auch, diese für den Gleitvorgang verantwortlichen Schleim- oder Protoplasmabänder in situ darzustellen (Abb. 22). Man sieht deutlich die verhältnismäßig dünne Auflagerung, von der die Keimoberfläche umgeben ist. Bei Abbildung 23 ist besonders die spiralige Anordnung der Antriebsbänder gut zu erkennen.

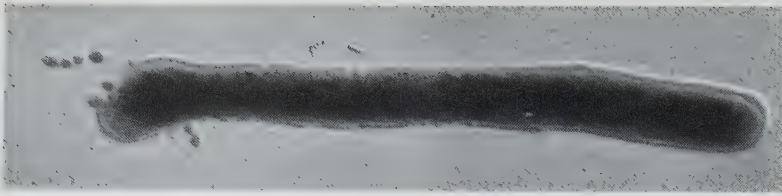


Abb. 22. Elektronenoptische Aufnahme eines unserer Keime nach schonender Vorbehandlung. Man erkennt deutlich den umgebenden Saum, der an einer Stelle lädiert ist und dort die bekannten perlschnurartigen Gebilde erkennen läßt. Vergr. 1:20 000, unfixiert, Platin-Iridium bedampft.

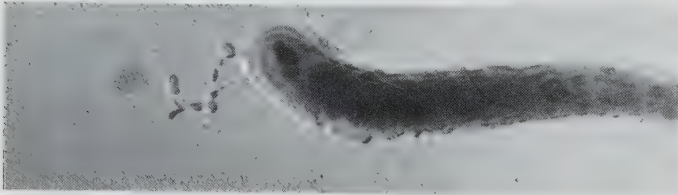


Abb. 23. Elektronenoptische Aufnahme wie in Abb. 22. Hier ist die spirale Anordnung der Antriebsbänder noch gut erhalten. Vergr. 1:20 000, unfixiert, Platin-Iridium bedampft.

Einen letzten eindeutigen Beweis für die der Oberfläche aufgelagerten Antriebsbänder gibt der Keimquerschnitt in Abbildung 6. Dort sieht man gut die der Keimoberfläche aufgelagerten Bänder im Querschnitt als kleine Erhebungen!

4. Die zusammenfassende Würdigung dieser Befunde läßt für die bisher sehr rätselhaften gleitenden Vorwärtsbewegungen unserer Keime folgende Faktoren feststellen:

a) Die Keime bewegen sich auf einer festen Unterlage gleitend vorwärts, wobei die Vorwärtsbewegung von einer schraubenartigen Drehung um die Längsachse begleitet wird.

b) Die schraubenartige Gleitbewegung wird bewirkt durch eine Art Raupenantrieb. Die aus klebrigem Material (Schleim, Protoplasma?) bestehenden Antriebsbänder umlaufen in entsprechenden Rillen die Keimoberfläche in spiraligen Bahnen.

c) Die eingangs erwähnte zuckungsartige Abknickbewegung ist als protoplasmatisch bedingte Kontraktibilität zu werten und bedarf als solche keiner weiteren Erklärung.

d) Die als charakteristisch für die Keime beschriebene Rotationsbewegung um einen fixierten Pol erklärt sich zwanglos als Kombination des schraubenartigen Raupenantriebs mit der aktiven Knickungsfähigkeit: Der sich um die Längsachse rotierend vorwärtsbewegende Keim knickt sich ab, so daß nur ein kleiner hinterer Teil an der Unterlage verbleibt, während der übrige Teil des Stäbchens mehr oder minder steil in die

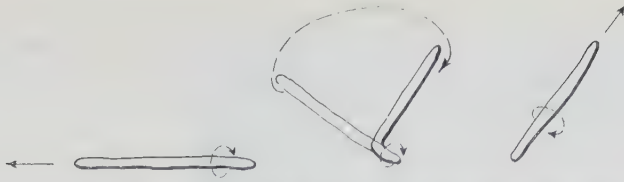


Abb. 24. Die Skizze veranschaulicht den Mechanismus der peitschenartigen Richtungsänderungen: a = gleitende Bewegung; b = Abknickung des Keimes und Einklappen in die Horizontalebene; c = vollzogene Richtungsänderung.

Höhe ragt. Der an der Unterlage haftende Teil wird nun durch den Schraubenantrieb weiter gedreht und damit wird der hochstehende Teil des Keimes wieder in die Horizontalebene zurückgeklappt. Damit ist die Richtungsänderung vollzogen (Abb. 24). Je nachdem wie groß der den Vorgang einleitende Abknickungswinkel ist um so stärker kann die folgende Richtungsänderung sein.

V. Der Lebenszyklus unserer Keime

1. Das Auftreten von eigenartigen runden Gebilden in älteren Kulturen von Fusobakterien ist ebenso unklar und umstritten wie die im letzten Kapitel behandelte Frage nach der Beweglichkeit.

A. R. Prévot (1938) hält das Bildungsvermögen solcher sphärischer Körper für eine so konstante und charakteristische Eigenschaft der Fusobakterien, daß er sie in die Familie der Spherothoraceae zusammenfaßt.

H. Beerens (1952) schließt sich dieser Meinung an, schränkt sie jedoch insofern ein, als er das Vorhandensein dieser Sphäroide als sehr inkonstant bezeichnet, denn es sei unmöglich diese Gebilde bei den entsprechenden Species nach Belieben hervorzubringen.

Dagegen waren solche kugelige Gebilde bei den Fusobakterienstämmen von M. Knorr (1922) bei aller sonstigen Polymorphie niemals aufgetreten.

Auch Boe (1941) konnte bei seinen 30 Stämmen weder Sporen noch sonst irgendwelche kokkoide Körper nachweisen, die als Bestandteil eines besonderen Lebenszyklus deutbar wären.

In den vorwiegend morphologischen Arbeiten von Hine und Berry (1937) und Baird-Parker (1953) ist ebenfalls keinerlei Hinweis auf das Vorkommen von Sphäroiden zu finden.

Die im Verlauf eines L-Zyklus bei Fusobakterien beschriebenen Gebilde (Klieneberger-Nobel, 1947; Dienes und Smith, 1943; Morris, 1953) dürften auf Grund ihrer abweichenden Morphologie und ihrer besonderen Kolonieforn mit den sphärischen Körpern unserer Keime kaum etwas gemein haben.

Eine Literaturübersicht über die bisher als unbegeißelte bewegliche „Fusobakterien“ beschriebenen Keime bestätigte im wesentlichen unsere Befunde.

So finden wir schon bei den „nadelförmigen“ Keimen von *Shmamine* (1912) mit ihren zuckenden Bewegungen in den beigegeführten Abbildungen neben den Keimen eine Anzahl von kugeligen Gebilden, die wir wohl als Sphäroide in unserem Sinne deuten möchten, obwohl der Autor diese Gebilde übersehen hat.

Auch die von *Malek* und *Malková* (1939) beschriebenen aeroben *Fusobakterien*, die wir wegen der von den Autoren beobachteten Vibrations- und Rotationsbewegungen als mit unseren Keimen verwandt ansehen, zeigen in älteren Kolonien häufig Anschwellungen, aus denen schließlich eine große Anzahl von runden Gebilden hervorgingen. Wir verweisen nochmals auf unsere Vermutung, daß die Autoren mit Mischkulturen gearbeitet haben werden; „aerobe“ *Fusobakterien* sind uns nur dann begegnet, wenn sie nicht rein waren.

Die erste Beschreibung der Sphäroide finden wir bei *Prévot* (1940) in Verbindung mit dem von ihm beschriebenen *Fusocillus girans*, den wir mit größter Sicherheit als mit unseren Keimen identisch betrachten können. *Prévot* schreibt: „In 4—5 Tage alten Kulturen erscheinen zuweilen unter nicht festzulegenden Bedingungen freie Gebilde, Sphäroide, von 1—1,5 μ Durchmesser. Die Sphäroide liegen einzeln, in Paaren oder in Tetraden. Die mehr voluminösen Formen von 2—3 μ Durchmesser erscheinen noch seltener, besonders in serumhaltigem oder durch Zuckervergärung stark saurem Milieu. Die Gebilde sind nicht willkürlich zu erhalten.“

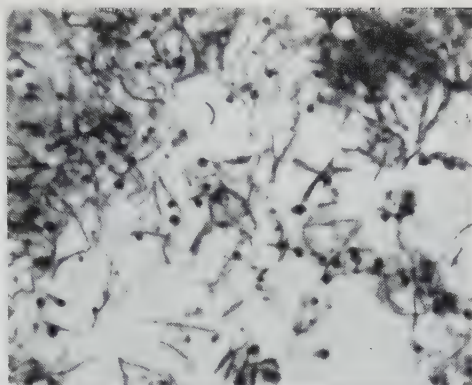
Erstaunlicherweise ist in der Arbeit von *MacDonald* (1953), der seiner Beschreibung nach zweifellos die gleichen Keime in Händen hatte wie wir, von Sphäroiden nicht die Rede. Vielleicht hat er in älteren Kulturen nicht danach gesucht oder er hatte Varianten isoliert, die zur Sphäroidbildung nicht mehr in der Lage sind. Solche sphäroidfreien Stämme haben wir zwar bis jetzt noch nicht gesehen, in Hinblick auf die später dargelegte Klassifizierung der Keime wäre ihr Vorkommen aber nicht ausgeschlossen.

Ähnlich scheinen die Verhältnisse auch bei den Untersuchungen von *A. H. Gins* (1940) zu liegen. Wir finden in seinen Arbeiten keine Hinweise darüber, daß er bei seinem *Spirillum buccale* Koch, dessen Identität mit unseren Keimen wir als wahrscheinlich annehmen, solche sphäroide Körper gefunden hatte.

Dagegen konnte *U. Berger* (1956) bei den von ihm untersuchten Stämmen von „*Fusobakterium girans*“ das Vorhandensein von Sphäroiden bestätigen: „Eine charakteristische Manifestation findet der Pleomorphismus der *Fusobakterien* in der Ausbildung runder Körper von ungleichmäßigem Durchmesser (1—3 μ). Sie treten in der Kultur schon nach wenigen Tagen zugleich mit spindeligen Auftreibungen der Stäbchen auf, die wahrscheinlich ein Übergangsstadium darstellen.“

An dieser Stelle ist es auch angebracht auf die Behauptung einiger Autoren einzugehen, daß *Fusobakterien* und *Spirochäten* ineinander über

Abb. 25. Die Abbildung zeigt einen „schnell kriechenden“, langen, fadenförmigen Stamm mit reichlicher Sphäroidbildung aus einer 7 Tage alten Oberflächenkultur. Man beachte die Größenunterschiede der runden Gebilde als Ausdruck verschiedener Entwicklungsstadien. Vergr. 1 : 1000, Fuchsinfärbung.



bzw. auseinander hervorgehen könnten, also nur verschiedene Erscheinungsformen im Lebenszyklus ein und desselben Mikroorganismus seien (R. Tunnickliff, 1923; G. Sanarelli, 1927; Dean und Dean, 1931). Dabei wird von allen Autoren festgestellt, daß als Bindeglied zwischen den beiden Erscheinungsformen runde, kugelige Gebilde auftreten, aus denen entsprechend den herrschenden Bedingungen Fusobakterien oder Spirochäten hervorgehen können. Sanarelli glaubte aus den sphärischen Körpern seiner Fusobakterien, die er mit den Namen *Heliconema Vincenti* belegt hatte, Spirochäten hervorgebracht zu haben. Die Abbildungen in seiner Arbeit, die seine „Fusobakterien“ zusammen mit dem sphärischen *Heliconema Vincenti* zeigen, gleichen täuschend den Bildern, die unsere Keime aus 5—7 Tage alten Kulturen nach erfolgter Sphäroidbildung ergeben. Auch die mehr oder minder stark gewundenen Formen sind uns nicht fremd, da die Keime infolge ihrer großen Flexibilität, besonders in gefärbten Präparaten sehr oft solche Windungen annehmen. Wir glauben mit unseren Ergebnissen eine plausible Erklärung für die eigenartigen Befunde von Sanarelli geben zu können. Sanarelli hat sicherlich mit Keimen der von uns beschriebenen Art gearbeitet und sein „*Heliconema Vincenti*“ ist nichts anderes als die bei diesen Keimen konstant auftretende Sphäroidform! Die Spirochäten, die er daraus hervorgehen sah, sind gewellte Formen dieser Keime, die infolge ihrer Flexibilität Spirochäten nur vorgetäuscht haben.

2. Diesen in ihrer Gesamtheit sehr unklaren und z. T. widersprechenden Literaturangaben stehen unsere Befunde sehr eindeutig gegenüber.

Die Bildung von sphärischen Gebilden in einer etwa 6—7 Tage alten Kolonie bei einem unserer ersten Stämme ließ uns zunächst an eine Verunreinigung denken. Wahrscheinlich ist dies anderen Autoren ebenso ergangen und sie haben diese Kulturen beiseite gelegt. Erst als diese Erscheinungen immer wieder bei sicheren Reinkulturen und konstant bei allen unseren Stämmen in etwa 4—6 Tage alten Kulturen aufzutre-

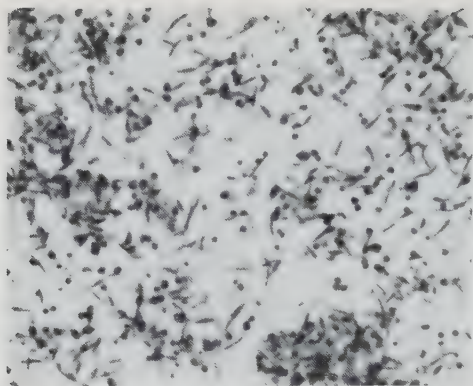


Abb. 26. In Analogie zu Abbildung 25 ein „langsam kriechender“ kurzer, spindelförmiger Keim, ebenfalls mit sehr massiver Sphäroidbildung. Das Präparat entstammt gleichfalls einer 7 Tage alten Oberflächenkultur. Vergr. 1:1000, Fuchsinfärbung.

ten pflegten war es uns klar, daß wir es hier mit den in der Literatur bei manchen „Fusobakterien“ beschriebenen Sphäroiden zu tun hatten.

Diese Gebilde sind besonders in etwa 7 Tage alten Oberflächenkulturen ziemlich massiv vorhanden, so daß die Stäbchen zahlenmäßig in den Hintergrund gedrängt werden (Abb. 25 und 26). Der Größendurchmesser variiert im gleichen Präparat von etwa 0,3 bis 3 μ , entsprechend dem jeweiligen Entwicklungsstadium in welchem die einzelnen Sphäroide sich gerade befinden. Die Gebilde färben sich mit den üblichen Anilinfarben ebenso wie die Keime selbst gut an. Nach Gram sind sie in Analogie zu den vegetativen Keimen nicht färbbar, die Feulgenfärbung enthüllt indessen eine Anhäufung von Chromatinsubstanz im Inneren der Sphäroide.

Im Nativpräparat weisen die Sphäroide bei Betrachtung im Dunkel-feld oder mittels Phasenkontrastmikroskop im Gegensatz zu den vegetativen Keimen keine Eigenbeweglichkeit auf.

Die zunächst an Sporen oder sporennähnliche Gebilde erinnernden runden Körperchen zeigen eine sehr geringe Widerstandskraft gegenüber chemisch-physikalischen Einwirkungen, denn man findet, daß besonders die großen, ausgereiften Formen schon bei den üblichen Färbeverfahren zum großen Teil zerstört werden. Ein Vergleich eines gefärbten Präparates mit einem Nativpräparat bei Phasenkontrastbeobachtung enthüllt, daß die großen Sphäroide bei dem Färbe-prozeß größtenteils verloren gehen. Diese, gegen eine Dauerform sprechende Hinfälligkeit der Gebilde wird bei der elektronenmikroskopischen Beobachtung verständlich. Die Aufnahmen (Abb. 29 und 30) zeigen deutlich, daß bei den Sphäroiden eine Hülle oder wenigstens eine Zellwand nicht vorhanden ist. Sie sind ebenso „nackt“ wie die vegetative Form der Keime.

Bei allen unseren Stämmen war die Sphäroidbildung ein regelmäßiges und konstantes Merkmal.

3. Anschließend an diese morphologische Beschreibung soll nunmehr versucht werden Zweck und Bedeutung dieser sphärischen Gebilde zu ergründen.

Die diesbezüglichen Angaben in der Literatur sind sehr dürftig. *Prévo*t begnügt sich mit der Feststellung, daß die Sphäroide seiner Keime 2—5 min. bei 80° C und 15—30 sec. bei 100° C ertragen könnten. Dies würde für eine sporenähnliche Dauerform sprechen. *Berger* fand dagegen relativ junge Kulturen (6 Tage alt), die fast ausschließlich aus solchen Körpern bestanden nicht immer mehr überimpfbar, was gegen eine sporenähnliche Funktion dieser Gebilde spricht.

Obwohl die schon oben beschriebene Hinfälligkeit der Sphäroide bei unseren Keimen die Annahme von Dauerformen recht unwahrscheinlich macht, haben wir trotzdem eine etwa vorhandene größere Resistenz gegenüber äußeren Einwirkungen zu ermitteln versucht. Wir wählten dazu einen Stamm aus, dessen Sphäroidbildungsvermögen besonders kräftig war und prüften die O₂-Empfindlichkeit, die Resistenz gegenüber Austrocknung und die Thermoresistenz bei jungen, sphäroidfreien Kulturen und im Vergleich dazu bei 7 Tage alten, stark sphäroidhaltigen Kulturen. Für den Versuch wurden rasenförmig mit den Testkeimen bewachsene *Fortner*platten verwendet; und zwar je eine Platte mit einer 7tägigen Kolonie und eine Platte mit einer 2tägigen, sicher sphäroidfreien Kolonie.

a) Sauerstofftoleranz

Die beiden F-platten wurden geöffnet, so daß der atmosphärische Sauerstoff freien Zutritt hatte und dann wurden die Platten mit einem gewöhnlichen Deckel geschützt im Brutschrank bei 37° C gehalten.

Nach 0, 6, 12, 18, 24 und 48 Stunden wurde von beiden Platten Material auf frische F-platten verimpft und diese anaerob bei 37° C bebrütet. Dabei stellte sich heraus, daß sowohl sphäroidfreie als auch sphäroidhaltige Kulturen nach einer O₂-Exposition von 6 Stunden nicht mehr vermehrungsfähig waren. Eine vermehrte O₂-Toleranz der Sphäroide ist also nicht vorhanden.

b) Empfindlichkeit gegen Austrocknung

Von den beiden rasenförmig bewachsenen F-platten wurden kleine Agarwürfel von etwa 5 mm Kantenlänge unter sterilen Kautelen herausgeschnitten und in sterilen Petrischalen bei 37° C im Trockenschrank getrocknet. Nach 0, 6, 12, 18 und 24 Stunden wurde je ein Agarstückchen mit den ausgetrockneten sphäroidhaltigen bzw. nichtsphäroidhaltigen Kulturen in ein Serumleberbrüheröhrchen gegeben und bebrütet. Das Ergebnis fiel wie nach Versuch a zu erwarten war aus: Außer den beiden sofort beimpften Röhrchen blieben alle folgenden unbewachsen. Sowohl vegetative Keime wie auch Sphäroide hatten die Austrocknungszeit von 6 Stunden nicht überlebt.

c) Temperaturtoleranz

Aus einer sphäroidhaltigen und einer sphäroidfreien Oberflächenkultur von F-platten (7 bzw. 2 Tage alt) wurden in Fleischwasserbouillon Keim-

suspensionen von etwa gleicher Konzentration hergestellt und aliquote Teile dieser Suspensionen im Ultrathermostat abgestuften Temperaturgraden für verschiedene Zeiten ausgesetzt. Die Keimsuspensionen wurden nach erfolgter Temperaturexposition auf F-platten verimpft und am Ausbleiben des Wachstums die Abtötung bestimmt. Die so für vegetative Keime und Sphäroide bestimmte Abtötungskurve in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur ist in Abbildung 27 wiedergegeben. Sie zeigt, daß den Sphäroiden gegenüber den vegetativen Keimen keine höhere Thermoresistenz zu eigen ist.

Die Ergebnisse aus diesen drei Versuchen beweisen eindeutig, daß die Sphäroide nicht als Dauerformen mit sporenähnlicher Funktion betrachtet werden können.

4. Wenn diese Gebilde aber keine Dauerformen mit erhöhter Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen sind, dann bleibt nur die Möglichkeit, daß es sich um besondere Erscheinungsformen im Verlaufe eines bestimmten Lebenszyklus bei diesen Keimen handelt.

Um einen solchen Zyklus nachzuweisen haben wir aus einer Fortnerplattenkultur täglich Präparate hergestellt und den Entwicklungsgang der Sphäroide in morphologischer und zeitlicher Hinsicht genau verfolgt. Bei einer Beobachtungsdauer von 9 Tagen konnte der Entwicklungsvorgang in der Abbildungsreihe 28 fotografisch festgehalten werden.

In den ersten 4 Tagen nach der Beimpfung sind Sphäroide noch nicht nachweisbar. Am 5. Tag sieht man vereinzelt kleine Sphäroide auftreten. Schon am 6. Tag ist dann ein sprunghaftes Ansteigen der Sphäroide an Zahl und Größe feststellbar, die vegetativen Keime treten mehr in den Hintergrund. Dies gilt unverändert auch für den 7. Tag, während am 8. Tag die Anzahl der Stäbchen sich wieder etwas vergrößert zu haben scheint. Am 9. Tag ist die Zahl der Sphäroide stark vermindert, das Gesichtsfeld wird jetzt wieder von den vegetativen Formen beherrscht, wobei als Ausdruck der ablaufenden Keimungsvorgänge häufig Kaulquappen- und Handelformen zu finden sind.

Die Versuchsreihe zeigt, daß das Auftreten der Sphäroide ein zyklischer Vorgang ist. Nach etwa 5 Tagen beginnen sich Sphäroide zu bilden, sie vermehren sich, und die vegetativen Keime treten in den Hintergrund. Etwa am 8. bis 9. Tag keimen dann die Sphäroide wieder zu vegetativen Formen aus. Es liegt demnach die Ursache für die Sphäroidbildung nicht an einer Nährbodenerschöpfung, sondern in einem immanenten zyklischen Lebenslauf dieser Keime begründet, denn die Sphäroide keimen auf dem gleichen Nährboden wieder aus, worauf sie sich gebildet haben.

Dieser Lebenszyklus war in der gleichen Art und in etwa den gleichen Zeitintervallen bei allen unseren Stämmen zu beobachten.

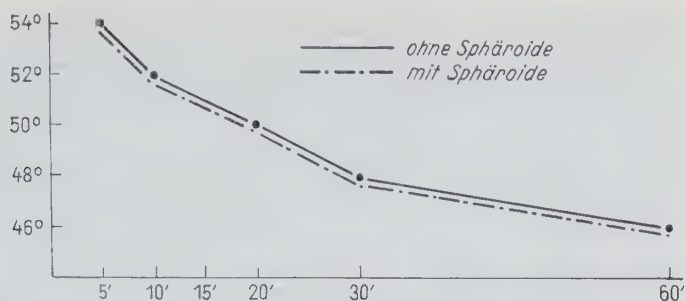


Abb. 27. Temperaturabtötungskurve für sphäroidhaltige und sphäroidfreie Keimsuspensionen. Beide Kurven haben den gleichen Verlauf. Die Sphäroide besitzen somit keine höhere Thermoresistenz als die vegetativen Formen.



Abb. 28. Lebenszyklus der Keime in Ablauf von neun Tagen. Vergr. 1:1000, Fuchsin-färbung.

- a) 4. Tag, noch keine Sphäroide.
- b) 5. Tag, beginnende Sphäroidbildung.
- c) 6. Tag, sprunghafter Anstieg der Sphäroide.
- d) 7. Tag, unverändertes Aussehen.
- e) 8. Tag, leichte Zunahme der Stäbchen.
- f) 9. Tag, zahlreiche neue Stäbchen, z. T. im Keimungsstadium.

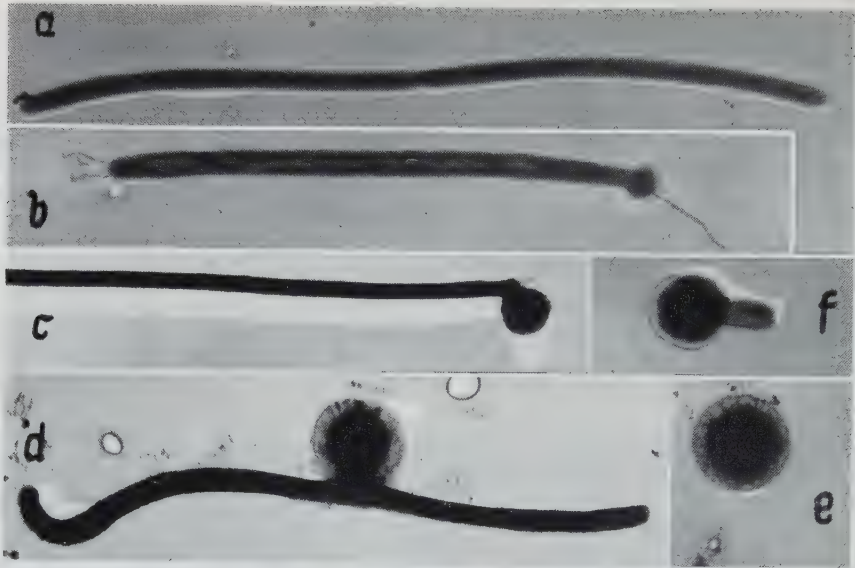


Abb. 29. Elektronenoptische Bilder vom Lebenszyklus eines fadenförmigen Stammes. Vergr. 1 : 10 000, OsO_4 -fixiert, Platin-Iridium bedampft. a) normaler vegetativer Keim. b) polar beginnende Sphäroidbildung. c) Sphäroid von mittlerem Reifungsgrad. d) fast ausgereiftes Sphäroid, noch adhaerend. e) freies, reifes Sphäroid. f) keimendes Sphäroid mit fingerförmigem Keimling.

Ein genauer Einblick in die morphologischen Vorgänge, die während dieses Entwicklungszyklus ablaufen ist bei der Kleinheit der Objekte mit dem Lichtmikroskop kaum mehr zuverlässig zu erhalten. Wir haben daher zum Studium der morphologischen Einzelheiten die im Verlauf des Zyklus auftreten, das Elektronenmikroskop herangezogen.

In einer großen Serie von Aufnahmen konnte der Lebenszyklus der Keime klar und eindeutig in allen seinen Phasen morphologisch belegt werden. Die Abbildungsreihen 29 und 30 zeigen den Entwicklungsgang von zwei verschiedenen Stämmen. Interessant ist die völlige Übereinstimmung der Vorgänge, die wir auch für die übrigen Stämme bestätigen konnten.

Man erkennt in den Abbildungsreihen, daß die Sphäroide zunächst als kleine Knospungen seitlich am Zelleib, häufig auch subpolar und polar in Erscheinung treten. Ein vegetativer Keim bringt immer nur ein einziges Sphäroid hervor. Die Ausstülpungen werden dann zunehmend größer bis sie ihre endgültigen Abmessungen erreicht haben; dann lösen sie sich von der Mutterzelle, die nach der Sphäroidbildung zum Absterben verurteilt ist. Aus dem freien Sphäroid bildet sich bei der Keimung eine zunächst fingerförmige Ausstülpung, die zuweilen infolge besonderer Weichheit dem Sphäroid direkt angelagert sein kann, so daß der Eindruck eines keimenden Samenkorns entsteht (Abb. 30 g). Im weiteren Verlauf reckt sich dann der Keimling und wächst zu einem neuen vege-

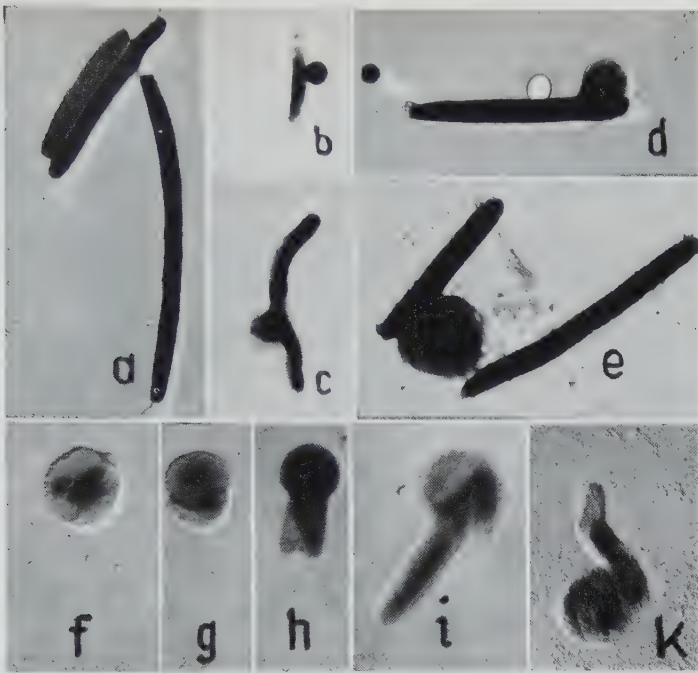


Abb. 30. Elektronenoptische Aufnahmen vom Lebenszyklus eines kurzen, spindelförmigen Keimes. Vergr. 1 : 10 000, OsO_4 -fixiert, Platin-Iridium bedampft. a) sphäroidfreie Stäbchen. b) ein Keim mit beginnender Sphäroidbildung. c) Sphäroid mittleren Reifegrades. d) subpolares Sphäroid, weiter ausgereift. e) subpolares Sphäroid, fast ausgereift. f) reifes, freies Sphäroid. g) keimendes Sphäroid. Keimling abgebogen, an keimendes Samenkorn erinnernd! h) keimendes Sphäroid. Seltener Fall, daß zwei Keimlinge aus einem Sphäroid entstehen. i) weiter ausgekeimtes Stäbchen. Das Sphäroid ist eierschalentypig gesprungen. k) Keimling, der sein Sphäroid fast verlassen hat.

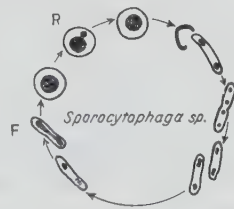


Abb. 31. Schematischer Kernzyklus bei *Sporocytophaga* sp. F = Verschmelzung der Kerne, R = Reduktionsteilung. (Nach K. A. Bisset: The cytology and life-history of bacteria. Edinburgh a. London.)

tativen Keim aus. In den meisten Fällen entsteht aus einem Sphäroid nur ein einziger vegetativer Keim, ausnahmsweise konnten wir jedoch auch zwei Keimlinge aus einem Sphäroid hervorgehen sehen (Abb. 30 h).

5. Welchen Sinn und Zweck hat nun dieser Lebenszyklus bei den hier beschriebenen Bakterien?

Wir vermuten, daß diese Vorgänge Ausdruck bestimmter autogamer Kernverschmelzungsprozesse sind. Nach K. A. Bisset (1955) verschmelzen bei Myxobakterien in der vegetativen Zelle zwei haploide Kerne zu einem nunmehr diploiden Kern, worauf als diploide Erscheinungsform die

Mikrocyste gebildet wird. In der Mikrocyste findet dann eine Reduktionsteilung statt und danach beginnt wieder eine haploide, vegetative Zelle auszukeimen (Abb. 31).

Somit wäre das vegetative Bakterium Bestandteil der haploiden Lebensphase, während das Sphäroid zumindestens eine gewisse Zeit bis zur erfolgten Reduktionsteilung die diploide Lebensphase darstellen würde.

Allerdings wäre auch denkbar, daß die autogame Kernverschmelzung schon sogleich noch im vegetativen Keim von einer Reduktionsteilung gefolgt wird, und daß die als seitliche oder polare Ausstülpungen entstehenden Sphäroide schon wieder einen reduzierten haploiden Kern mit auf den Weg bekommen. Diese Annahme, wobei also auch die Sphäroidphase schon wieder haploid wäre, scheint uns für unsere Keime wahrscheinlicher, denn der von Bisset für Myxobakterien angenommene Entwicklungsgang ist bei unseren Keimen und übrigens auch bei Sporocytophaga etwas anders.

Der Zweck des hier beschriebenen, für unsere Keime obligatorischen Lebenszyklus scheint darin zu liegen, daß nach einer gewissen Zeit ungeschlechtlicher Vermehrung durch Teilung die autogamen Kernverschmelzungsvorgänge und die darauf folgende Reduktionsteilung eine Umkombination der vorhandenen Gene bewirkt, wodurch der Keim offenbar neue Lebensimpulse empfängt.

VI. Die Klassifizierung und Benennung unserer Keime

1. Die von den bisherigen Beobachtern (Prévot, MacDonald, Berger) auf Grund der morphologischen Ähnlichkeit vorgenommene Einordnung dieser Keime in die Gattung *Fusobakterium* ist bei den in den vorangehenden Kapiteln herausgestellten Eigenschaften und Besonderheiten dieser Keimgruppe nicht haltbar. Die typischen, durch einen speziellen Bewegungsapparat bewirkten Gleitbewegungen der Keime, ihre durch das Fehlen einer Membran bedingte Flexibilität, ihr aktives Kontraktionsvermögen und nicht zuletzt der in konstantem Rhythmus zwischen vegetativer und Sphäroidform verlaufende Lebenszyklus sind den *Fusobakterien* fremd und müssen bei einer Klassifizierung entsprechend Berücksichtigung finden.

Auch die von A. H. Gins durchgeführte Einreihung in die Gruppe der Spirillen (*Spirillum buccale* Koch) entbehrt jeglicher Grundlage. Nach den eigenen Angaben von Gins besitzt dieses „*Spirillum*“ weder eine Begeißelung noch sind auch nur einigermaßen regelmäßige und konstante Windungen vorhanden. Die von ihm als Windungen gedeuteten Flexibilitätsercheinungen, wie Haarnadelform, U-Form und Kreisform sind nichts anderes als im fixierten Präparat erstarrte Aus-

drucksformen des den Keimen eigenen Kontraktions- und Biegungsvermögens.

Eine Verwandtschaft zu den Spirochäten, wie sie aus den zuweilen in manchen Präparaten gehäuft zu findenden Windungen schließend, auch *Shmamine* für seine „nadelförmigen“ Keime angenommen hat, ist ebenfalls nicht vorhanden. Zwar ist beiden Keimarten die Flexibilität und die aktive, geißellose Fortbewegung gemeinsam, jedoch ist die gesamte Morphologie, die Art der Bewegung und das ganze übrige Verhalten so von Spirochäten verschieden, daß man die Keime nie zu den Spirochäten in Beziehung setzen kann.

Wir haben uns daher bei der Suche nach ähnlichen Mikroorganismen von den üblichen, in der medizinischen Mikrobiologie bekannten Bakterien entfernt und sind, indem wir Flexibilität, fehlende Zellwand und vor allem gleitend-kriechende Fortbewegungsart als Leitfaden verwendeten, auf die in der freien Natur weitverbreitete Gruppe der Myxobakterien gestoßen. Bei diesen Keimen, die nicht mehr der Ordnung der Eubakterien angehören, sondern infolge ihrer Besonderheiten eine eigene Ordnung in der mikrobiologischen Einteilung von *Bergey* gefunden haben, fanden wir die charakteristischen Eigenschaften unserer Keime in geradezu verblüffender Übereinstimmung wieder.

Die Myxobakterien sind gekennzeichnet durch Kriechbewegungen auf festen Oberflächen, durch große Flexibilität der Zellen mit aktivem Krümmungsvermögen und durch die Eigenschaft, aus den vegetativen, zumeist stäbchenförmigen Keimen in bestimmten Lebensphasen runde Gebilde, die sog. Mikrocyten hervorgehen zu lassen. (*Bergey*, 1948; *Krassilnikov*, 1959)

Die meisten Myxobakterien kriechen in bestimmten Lebensphasen zu großen Massen zusammen, wandeln sich dann in die genannten Mikrocyten um, die in großer Anzahl vereinigt zumeist von Schleimsubstanzen zusammengehalten sog. Fruchtkörper bilden. Diese häufig baumartig oder pilzförmig gestalteten Fruchtkörper setzen wieder eine große Anzahl vegetativer Myxobakterien in Freiheit. Die Myxobakterien sind streng aerobe Keime, sind im Boden, Dung, faulendem Holz und Blättern in großer Anzahl zu finden und spielen als Zellulosezersetzer im Haushalt der Natur eine gewichtige Rolle.

Die in *Bergeys Manual of determinative Bacteriology* von *Beebe* und *Buchanan* durchgeführte Klassifizierung der Myxobakterien beruht in erster Linie auf der Form und dem Aussehen der Mikrocyten und Fruchtkörper. Dabei wurden die Myxobakterien in fünf Familien unterteilt, nämlich *Cytophagaceae*, *Archangiaceae*, *Sorangiaceae*, *Polyangiaceae* und *Myxococcaceae*.

Besonders die Familie der *Myxococcaceae*, die durch die Bildung von runden oder ellipsoiden Mikrocyten gekennzeichnet ist, davon wiederum die Gattung *Sporocytophaga* verdient in Beziehung zu unseren Keimen besondere Beachtung. Die Myxobakterien vom Genus *Sporo-*

cytophaga haben nämlich die Eigenschaft zwar Mikrocyten zu bilden, es fehlt jedoch bei ihnen die Fruchtkörperbildung, d.h. die gebildeten Mikrocyten bleiben ohne besondere Ansammlung einfach zwischen den vegetativen Zellen verteilt in der Kultur liegen. Bei den Sporocytophaga liegen demnach die gleichen Verhältnisse in Bezug auf Sphäroidbildung vor wie bei unseren Keimen.

2. Wir sind demzufolge der festen Ansicht, daß es sich bei unseren Keimen um Myxobakterien handeln muß. Im Folgenden soll nun durch eine Gegenüberstellung der wesentlichsten Eigenschaften von Myxobakterien und den von uns aus der Mundhöhle gezüchteten Keimen der Beweis für diese Behauptung erbracht werden.

a) Vergleichende Morphologie:

Die Myxobakterien sind meistens längliche, schlanke Zellen von ausgeprägter Flexibilität. Neben fadenförmigen Keimen mit abgerundeten Enden finden sich bei vielen Myxobakterien zugespitzte Enden und spin-delige Gestalt. Besonders bei den Cytophaga und den Sporocytophaga ist die Spindelform der Zellen ein charakteristisches Merkmal. „Fusobakterien“ sind demnach in der Ordnung der Myxobakterien eine nicht seltene Erscheinung! Aber auch in den Größenverhältnissen der Zellen finden wir zwischen Myxobakterien und unseren Keimen eine große Übereinstimmung. Die Zellen der Sporocytophaga haben eine Länge von $2,5-8\mu$ und eine Breite von $0,3-0,4\mu$ (Krassilnikov). Die Membranfrage wird bei den Myxobakterien in Übereinstimmung mit unseren Keimen dahingehend beantwortet, daß sie — wenn überhaupt vorhanden — zumindest äußerst zart und elastisch sein müsse. Als besonderes Charakteristikum wird bei den Myxobakterien das Vorhandensein von verhältnismäßig gut ausgebildeten Chromatinkernen angegeben (Krassilnikov), eine Erscheinung, die wir auch bei unseren Keimen beobachten konnten.

b) Die Beweglichkeit:

Wie schon ausgeführt, ist den Myxobakterien als wesentliches Charakteristikum, eine gleitend-kriechende Fortbewegungsart eigen. Die Geschwindigkeiten dieser bislang ursächlich noch nicht geklärten Kriechbewegungen variieren bei den einzelnen Myxobakterienarten von $10\mu/\text{Minute}$ (Bergey) bis zu $150\mu/\text{Minute}$ (Stanier, 1940); nach E. Speyer (1953) $180-240\mu/\text{Minute}$ bei Sporocytophaga. Diese Geschwindigkeiten, besonders die der schnellen Sporocytophage, stimmen gut mit den entsprechenden Werten bei unseren Keimen überein. Außerdem finden sich die Myxobakterien bei ihren Kriechbewegungen auf festen Oberflächen häufig zu parallel angeordneten Gruppen zusammen, um sich dann gemeinsam mit gleicher Geschwindigkeit nebeneinandergelagert fortzubewegen; eine Erscheinung, die wir auch bei unseren Keimen auf der Deck-

glasoberfläche demonstrieren konnten. Die Abbildungen von *Meyer-Pietschmann* (1951), die auf Agaroberflächen sich bewegende aerobe Myxobakteriengruppen zeigen, gleichen in ihrer typischen Form den Bildern, die wir auch bei unseren Keimen während des Kriechens auf trockenen Oberflächen zu sehen gewohnt sind (Abb. 16).

Auch die bei unseren Keimen sehr häufig zu beobachtenden Rotationsbewegungen um ein angeheftetes Zellende, das *Prévot* veranlaßt hatte ihnen die Bezeichnung *Fusocillus „girans“* zu verleihen, ist bei den Myxobakterien charakteristisch. Bei *Meyer-Pietschmann* (1951) finden wir darüber folgende Beschreibung: „Bei den Myxobakterien handelt es sich dagegen um eine eigenartige gleitend-kriechende Fortbewegung, zu der sie einer Haftfläche bedürfen; die Zelle ist dabei aktiv biegsam. In Flüssigkeiten kommt eine Kriechbewegung nur dann zustande, wenn die Zellen in ihrer ganzen Länge einer Oberfläche anhaften. Berühren sie eine solche nur mit einem Zellende, so führen sie hin und herschwingende, kreisende Bewegungen aus, wobei sie gelegentlich mit der Anhaftsstelle an der Fläche etwas weitergleiten können. Führen die schwingenden Bewegungen zur Berührung der Fläche mit der ganzen Zelle, so gehen sie in die Kriechbewegung über.“

E. Speyer (1953) schreibt über die Rotationsbewegungen der Myxobakterien: „Berührt ein Stäbchen nur einendig eine solche Fläche, so macht das freie Ende charakteristische Pendel- oder Kreiselbewegungen, bis die ganze Länge der Zelle wieder in Verbindung mit der Fläche kommt.“

Diese Beschreibungen könnten ebenso gut unsere Keime betreffen, was wiederum als Beweis für die Myxobakteriennatur unserer Bakterien gelten kann.

c) Mikrocystenbildung:

Der bei unseren Keimen beschriebene Lebenszyklus, d. h. die Entstehung von sphärischen Körpern aus den vegetativen Keimen ist ebenfalls ein Charakteristikum der Myxobakterien. Bei der Gattung *Sporocytophaga* unterbleibt jedoch in Übereinstimmung mit unseren Keimen die Fruchtkörperbildung, so daß die Mikrocysten diffus neben den vegetativen Keimen in der Kultur liegen bleiben. Allerdings soll nach den Literaturangaben die Bildung der Mikrocysten bei den *Sporocytophaga* dadurch zustande kommen, daß die vegetativen Zellen sich in der Mitte aufblähen und dann zu schrumpfen beginnen bis sich das ursprüngliche Stäbchen in eine Kugel verwandelt hat (*Speyer, Krassilnikov*). Dieser, von der Sphäroidbildung unserer Keime insofern abweichende Entstehungsmodus, als bei unseren Keimen die Sphäroide seitlich oder polar aus dem Stäbchen ausknospen, ist aber nach unseren eigenen Untersuchungen an *Sporocytophaga myxococcoides* nicht mehr vertretbar. Es besteht vielmehr, wie wir noch zeigen

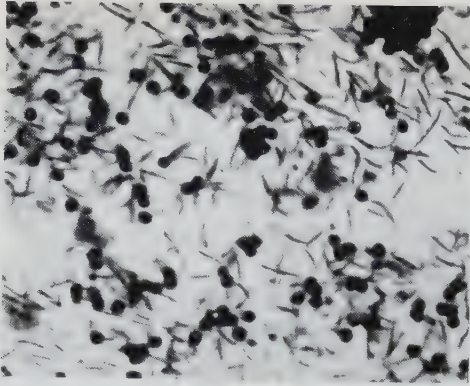


Abb. 32. *Sporocytophaga myxococcoides* zum Vergleich mit unseren Keimen. Die spindeligen vegetativen Zellen und die zahlreich dazwischen gelagerten Mikrocyten ergeben ein den unserigen Keimen sehr ähnliches Bild (vgl. besonders Abb. 26). Als einziger Unterschied ist die kompaktere und voluminösere Gestaltung der Mikrocyten feststellbar. Vergr. 1 : 1000, Fuchsinfärbung.

werden, praktisch kein Unterschied im Sphäroidbildungsmechanismus bei *Sporocytophaga* und unseren Keimen. Allerdings scheint insofern ein gewisser Unterschied zwischen den ausgereiften Mikrocyten der *Sporocytophaga* und unseren Sphäroiden zu bestehen, als die Mikrocyten der *Sporocytophaga* im reifen Zustand von größerer Kompaktheit und Festigkeit als unsere Sphäroide sind. Wir haben es daher vorgezogen für die sphärische Lebensform unserer Keime die Bezeichnung Sphäroid beizubehalten, da wir die mit dem Wort Cyste in der Mikrobiologie verknüpfte Vorstellung einer resistenten Dauerform für unsere Sphäroide nicht beanspruchen können.

Als einzigen, allerdings wesentlichen Unterschied zwischen den Myxobakterien vom Genus *Sporocytophaga* und unseren Keimen konnten wir die strikte Anaerobiose unserer Keime feststellen. Dies war bisher bei den Myxobakterien unbekannt. Alle Arten galten ohne Ausnahme als strikt aerobe Keime.

3. Diese aus der Literatur zu entnehmende Übereinstimmung unserer Keime mit den Myxobakterien hat uns veranlaßt einen *Sporocytophaga*-stamm vergleichsweise zu unseren Keimen zu untersuchen, um so ein endgültiges Urteil fällen zu können. Wir verwendeten dazu einen Stamm der Species *Sporocytophaga myxococcoides*, den wir der Freundlichkeit der American Type Culture Collection verdanken.

Der Stamm zeigte schon in der Oberflächenkultur, mit schleimig-konfluierendem Wachstum und ausgeprägter gelber Koloniefärbung eine große Ähnlichkeit mit den Kolonien unserer Keime.

Bei mikroskopischer Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop und im gefärbten Präparat fand sich dann eine große Ähnlichkeit beider Keimarten (Abb. 32). Form und Aussehen der vegetativen Keime, wie

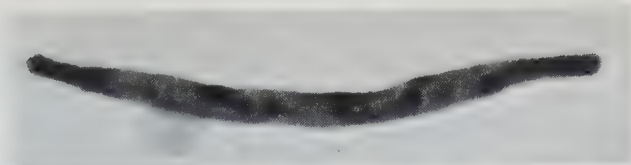


Abb. 33. Elektronenoptische Aufnahme von *Sporocytophaga myxococcoides*. Die typische Spindelform der Zelle ist gut sichtbar, außerdem das Fehlen einer festen Zellmembran an der Weichheit und fehlenden Randschärfe. Ein Vergleich mit entsprechenden Aufnahmen unserer Keime enthüllt die Verwandtschaft (vgl. Abb. 5). Außerdem sind unregelmäßig angeordnete Kernäquivalente zu erkennen. Vergr. 1 : 15 000, OsO_4 -fixiert, Platin-Iridium bedampft.



Abb. 34. *Sporocytophaga myxococcoides* (elektronenoptisch) im kernhaltigen Stadium. Deutlich sind die runden kompakten Gebilde zu je vierein pro Zelle erkennbar. Vergr. 1 : 10 000, OsO_4 -fixiert, Platin-Iridium bedampft.



Abb. 35. Der Lebenszyklus von *Sporocytophaga myxococcoides* in elektronenoptischen Aufnahmen (vgl. dazu Abb. 29 u. 30). Vergr. 1 : 10 000, OsO_4 -fixiert, Platin-Iridium bedampft. a) vegetative Keime. b) polare Mikrozyste mittleren Reifungsgrades. c) fast ausgereifte Mikrozyste, seitlich anliegend. d) freie, reife Mikrozyste; sie ist kompakter als unsere Sphäroide. e) keimende Mikrozyste; wie bei unseren Sphäroiden. f) leere Mikrozyste; der Keimling ist ausgeschlüpft.



Abb. 36. Elektronenoptische Aufnahme von *Sporocytophaga myxococcoides*. Man sieht eine lange, fadenförmige Zelle, von deren Oberfläche eine große Anzahl „perlschnurartiger“ Gebilde abgehen. Es handelt sich dabei um die abgesprengten Fortbewegungsraupen. Vergr. 1 : 10 000, OsO_4 -fixiert, Platin-Iridium bedampft.

auch die vorhandenen Mikrocysten und ihre Lagerung ließen keinen Zweifel mehr an einer echten Verwandtschaft beider Keimarten bestehen. Auch die typischen Kriechbewegungen, die aktive Kontraktibilität der Zellen und ihre ebenfalls gut sichtbaren Rotationsbewegungen waren ein klarer Beweis für diese Ansicht.

Die Verwandtschaft der beiden Keimarten konnte durch elektronenoptische Untersuchungen vollends bestätigt werden. Die *Sporocytophagazellen* zeigen im elektronenmikroskopischen Bild die gleiche Weichheit und fehlende Randschärfe wie unsere Keime. Bemerkenswert ist auch die ausgeprägte Spindelform der Zellen (Abb. 33). Schließlich stimmen auch die gut sichtbaren Kernäquivalente mit den Befunden an unseren Keimen überein (Abb. 34).

Der Vorgang der Mikrocystenbildung, den wir entsprechend wie bei unseren Keimen in seinen verschiedenen Entwicklungsphasen elektronenoptisch erfassen konnten, zeigte eine Identität mit unseren Keimen (Abbildungsreihe 35).

Der bisher bei Myxobakterien angenommene Mikrocystenbildungsvorgang durch Verkürzung und Abrundung der vegetativen Zellen muß daher zumindestens für die *Sporocytophaga* eine Korrektur erfahren. Die beigelegte Abbildungsreihe zeigt eindeutig, daß auch bei den *Sporocytophaga* die Mikrocystenbildung durch zeitliche, subpolare oder polare Ausknospungen von zunächst kleinen, sich stetig vergrößernden Kugeln erfolgt. Auch die Keimungsvorgänge der Mikrocysten sind denen unserer Sphäroide völlig gleich (Abb. 35 e).

Der bisher bei den Myxobakterien noch strittige Mechanismus ihrer Gleitbewegungen, der entweder auf Schleimausscheidungsvorgänge oder

auf Kontraktionswellen beruhen sollte, konnte in unserem Sinne geklärt werden (siehe Kapitel IV). Es zeigte sich nämlich, daß auch bei *Sporocytophaga myxococcoides* die beschriebenen „perlschnurartigen“ Gebilde, die von uns als spiralig umlaufende Gleitbänder („Raupenkettchen“) gedeutet werden, nachweisbar sind.

In Abbildung 36 sieht man deutlich die allseitig vom Zelleib durch den Präparationsvorgang abgesprengten perlschnurartigen Gleitbänder.

Man kann daraus wohl schließen, daß der für unsere Keime geltende Bewegungsmechanismus auch bei den übrigen Myxobakterien zutreffend ist.

Der Vergleich unserer Keime mit den Myxobakterien sowohl aus Literaturangaben wie auch im Experiment lassen keinen Zweifel mehr bestehen, daß unsere Keime den Myxobakterien zugeordnet werden müssen. Unsere Befunde, wonach Myxobakterien häufig in der menschlichen Mundhöhle vorkommen, stellen in der Mikrobiologie ein Novum dar. Myxobakterien waren bisher nur als Boden- und Dungbewohner bekannt, ihr Vorkommen bei Mensch oder Warmblütler war bislang unbekannt. Möglicherweise haben sich diese anaeroben Myxobakterien im Laufe der Zeit durch Adaptationsvorgänge aus mit roher, pflanzlicher Nahrung aufgenommenen aeroben Myxobakterien in der Mundhöhle entwickelt. Ein Vorgang wie er übrigens auch bei den Actinomyceten angenommen werden muß.

4. Die Klassifizierung der beim Menschen vorkommenden anaeroben Myxobakterien muß einerseits die sehr nahe Verwandtschaft zu den in der freien Natur vorkommenden Stämmen vom Genus *Sporocytophaga* berücksichtigen, andererseits gestatten die vorhandenen Unterschiede, besonders die strikte Anaerobiose dieser Keime es nicht sie als neue Species der *Sporocytophaga* aufzunehmen; zumal wir morphologisch bei unseren Stämmen bis jetzt zumindestens zwei verschiedene Species unterscheiden können.

Wir schlagen deshalb vor, diese neu entdeckte Gruppe von anaeroben, in der menschlichen Mundhöhle häufig anzutreffenden Myxobakterien in die Familie der *Myxococcaceae* einzureihen und für sie ein neues, weiteres Genus zu begründen. Als Genusbezeichnung nehmen wir, unter Berücksichtigung der Cytophagaähnlichkeit einerseits und der relativen Hinfälligkeit der gebildeten Mikrocysten andererseits — für die wir deshalb die Bezeichnung Sphäroide vorziehen — den Namen

Sphaerocytophaga

Auf Grund der bisherigen Befunde, die im wesentlichen zwei morphologisch differente Arten unterscheiden ließen, nämlich einerseits den Typ des fadenförmigen Keimes mit mehr abgerundeten Enden und anderer-

seits den an beiden Enden zugespitzten, spindelförmigen Typ möchten wir zunächst in den neuen Genus zwei Species errichten:

1. *Sphaerocytophaga filiformis* (Abb. 1 und 4)
2. *Sphaerocytophaga fusiformis* (Abb. 2 und 5)

Wobei allerdings die Größenabmessungen beider Species in Länge und Breite gewissen Schwankungen unterworfen sein können, so daß wir bei den beiden Species große und kleine Formen vorfinden können.

Der Name „Cytophaga“ stammt von *H. B. Hutchinson* und *J. Clayton* (1919) die einen neuen aeroben Mikroorganismus isoliert hatten, der besonders durch eine große Flexibilität einerseits und andererseits durch ein ausgeprägtes Vermögen Zellulose d.h. Pflanzenzellen abzubauen charakterisiert war. Sie benannten diesen Keim daher *Spirochaeta cytophaga*.

S. Winogradsky (1929) erkannte dann richtig, daß es sich hierbei nicht um Spirochaeten handeln könne und belegte daher diese Keimgruppe mit dem Namen *Cytophaga*.

H. Krzemieniewska (1930 und 1933) unterzog diese Befunde einer genauen Prüfung und kam zu dem Ergebnis, daß *Spirochaeta cytophaga* von *Hutchinson* und *Clayton* und die Gruppe der *Cytophaga* von *Winogradsky* zwar eng verwandt seien, daß aber *Spirochaeta cytophaga* durch die Bildung von rundlichen Körpern ausgezeichnet sei, während die *Cytophaga* nicht zur Bildung solcher Gebilde imstande seien.

Darauf begründete *R. Y. Stanier* (1940) seine Einteilung, indem er die *Cytophaga*, die also keine Mikrocysten bilden zu einer neuen Familie innerhalb der Ordnung der Myxobakterien zusammenfaßte, während er die mikrocystenbildende Form als Genus *Sporocytophaga* in die Familie der *Myxococcaceae* einfügte.

Die Bezeichnung „cytophaga“ wurde demnach von der ursprünglichen *Spirochaeta cytophaga* übernommen, obwohl sich mittlerweile herausgestellt hat, daß auch die übrigen Myxobakterien zum größten Teil als Zellulosezerersetzer anzusehen sind.

Darüber hinaus wurde inzwischen gefunden, daß die meisten Myxobakterien in der Lage sind andere lebende Mikroorganismen wie Bakterien, Algen, Hefen und auch Viren zu töten und zur Auflösung zu bringen, so daß die Bezeichnung *Cytophaga* = Zellfresser eigentlich einer wesentlich größeren Anzahl von Myxobakterien zukommen müßte (siehe nächstes Kapitel!).

Unter diesen Gesichtspunkten ist die von uns gewählte Bezeichnung *Sphaerocytophaga* für die anaeroben Myxobakterien beim Menschen zu sehen. Obwohl wir für unsere Myxobakterien eine zellfressende Eigenschaft bislang noch nicht mit Sicherheit nachweisen konnten (wenngleich

manche Beobachtungen in diese Richtung weisen!) möchten wir trotzdem diesen Namen beibehalten, da hiermit in erster Linie die nahe Verwandtschaft unserer Keime zu der Gattung *Sporocytophaga* in morphologischer und physiologischer Hinsicht zum Ausdruck gebracht werden soll.

VII. Pathogenitätsfragen

1. Das Vorkommen von Myxobakterien in der menschlichen Mundhöhle und ihre z. T. sehr große morphologische Ähnlichkeit mit den Fusobakterien läßt die häufig bei entzündlich-nekrotisierenden Prozessen in Mund- und Rachenhöhle und auch im Bereich des Zahnhalteapparates anzutreffende typische anaerobe Bakterienflora, die sog. Fusospirochätosen oder Fusospirillosen in neuem Licht erscheinen. In Nativpräparaten aus Material, das im gefärbten Präparat das typische Bild einer Fusospirochätose bietet, konnten wir häufig bei Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop nachweisen, daß ein großer Teil der als Fusobakterien angesprochenen Keime an der Objektträgeroberfläche die charakteristischen Gleitbewegungen der Myxobakterien vollführten. Man muß jedoch im sog. „falschen hängendem Tropfen“ auf die Glasoberfläche einstellen, um die Myxobakterien beobachten zu können, denn in der freien Flüssigkeit scheinen sie unbeweglich. Oft lassen sich in Luftblasen des Präparates an der „trockenen“ Glasoberfläche sogar die für Myxobakterien charakteristischen Keimformationen beobachten (Abb. 37 und 38).

Unter diesen Gesichtspunkten erscheint es angebracht, die herkömmliche Bezeichnung „Fuso-spirochätäre Symbiose“ für diese anaerobe Mischflora zu korrigieren. Man müßte genau genommen nunmehr von einer „Myxo-fuso-spirochätären Symbiose“ reden, wobei offen bleiben mag, ob der Ausdruck Symbiose für das Zusammentreffen dieser anaeroben Keime überhaupt zutreffend ist. Demnach wäre es besser die Bezeichnung Myxo-fuso-spirochätose bzw. -spirillose zu verwenden.

Die von H. A. Gins inaugurierte Bezeichnung Spirillose halten wir aus verschiedenen Gründen für nicht zutreffend. Einmal deswegen, weil sicherlich der größte Teil der von Gins mit seinem Styroflexabdruckverfahren aus Originalmaterial gewonnenen Präparate Spirochäten und keine Spirillen zeigt. Zum anderen deshalb, weil von den beiden Keimen, die Gins als typische Vertreter seiner Spirillen herausgestellt hat das *Spirillum buccale* Koch mit größter Wahrscheinlichkeit mit unserem *Sphaerocytophaga filiformis* identisch ist. Die Spirillose nach Gins wäre demnach ebenfalls besser als Myxospirillose zu bezeichnen.

2. Auch für die Ätiologie der Fusospirochätosen ergeben sich daraus neue Gesichtspunkte. Das Vorhandensein von Myxobakterien in der an-

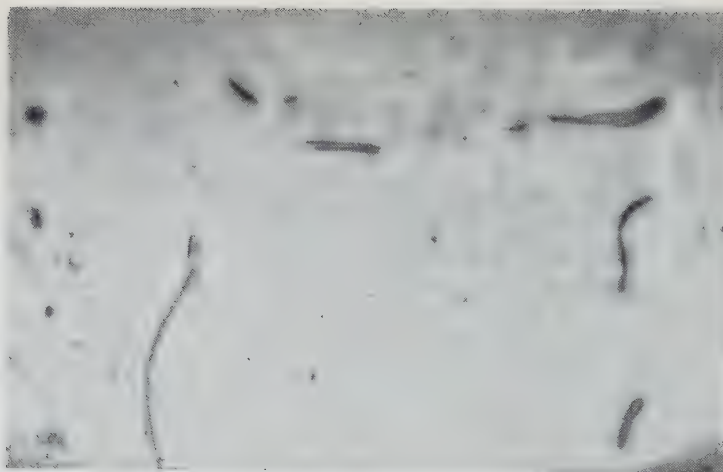


Abb. 37. Phasenkontrastaufnahme von kriechenden Myxobakterienformationen. Originalmaterial einer Zahnfleischtasche auf „trockener“ Glasoberfläche. Rechts oben ist eine besonders schöne Gruppe von beweglichen Myxobakterien zu sehen. Links unten Spirochäten und andere Keime. Also eine typische Myxo-spirochätose! Vergr. 1 : 1000.

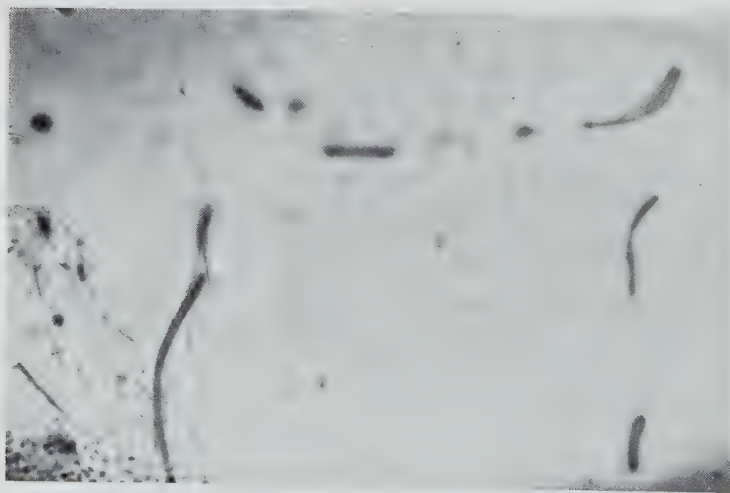


Abb. 38. Dieselbe Aufnahme wie Abb. 37, jedoch etwa 10 sec später aufgenommen. Man sieht, wie sich die Keimgruppe rechts oben in einer kreisförmigen Bahn weiterbewegt hat. Auch links unten am oberen Ende des großen, dicken Keimes haben sich die in Abb. 37 gut als spindelförmig erkennbaren Keime nach oben bewegt. Die Unschärfen in beiden Aufnahmen sind durch die z. T. verhältnismäßig großen Kriechgeschwindigkeiten der Myxobakterien bedingt. Vergr. 1 : 1000.

aeroben Mundhöhlenflora wirft die Frage auf, ob nicht gerade den Myxobakterien eine ätiologische Bedeutung bei den genannten entzündlichen nekrotisierenden Prozessen zukommt.

Die experimentelle Erzeugung einer Fusospirochätose im Tierversuch war bisher mit Reinkulturen von Fusobakterien und Spirochäten oder mit Reinkulturgemischen dieser Keime nicht möglich. Die von einigen Autoren mit gemischten Reinkulturen beim Tier erzeugten Abscesse (D. T. Smith, 1932; P. Séguin und R. Vincent, 1941) waren in neuerer Zeit nicht mehr reproduzierbar (U. Berger).

Anders hingegen liegen die Verhältnisse bei Verimpfung von Originalmaterial aus fuso-spirochätären Prozessen. Spritzt man solches Originalmaterial, am besten unter gleichzeitiger Quetschung des Gewebes, einem Versuchstier (Meerschweinchen) unter die Haut, so kann in den meisten Fällen Abscess- oder Phlegmonenbildung beobachtet werden, wobei die typische Ausgangsflora, auch in den künstlich erzeugten Krankheitsprozessen, wieder nachweisbar ist. (E. S. Hemmens und R. W. Harrison, 1942; T. Rosebury, 1952)

An typischer Stelle, d. h. im Zahnfleischbereich ist zumindest bei resistenzgeschwächten Tieren mit Originalmaterial gelegentlich die Erzeugung einer Gingivitis bzw. Stomatitis ulcerosa gelungen (U. Berger). Auch bei resistenzgeschwächten Menschen war mit Originalmaterial, nicht aber mit Reinkulturen (!) die Übertragung einer fortschreitenden Gingivitis mit folgender Zahnlockerung gelungen (Zschiegner 1946).

Wir stehen somit vor der Tatsache, daß mit Reinkulturen von Fusobakterien und Spirochäten eine pathogene Wirkung nicht zu erzielen ist, daß aber mit Originalmaterial direkt von fusospirochätären Prozessen in den meisten Fällen die Erzeugung entsprechender Infektionen gelingt. Wenn man nicht eine wesentliche Virulenzabnahme bei den in Reinkulturen gezüchteten Keimen annehmen will, verbleibt für diesen seltsamen Tatbestand nur eine Erklärungsmöglichkeit; nämlich, daß bei den Reinkulturversuchen ein für das pathogene Geschehen maßgeblicher Keim übersehen worden war. Dieser Keim wäre in den von uns beschriebenen anaeroben Myxobakterien u. U. gegeben.

Diese Vermutung erhält eine Stütze durch die Tatsache, daß ein großer Teil der in der freien Natur vorkommenden Myxobakterien in der Lage ist, andere lebende Mikroorganismen zu töten und zur Auflösung zu bringen. Es konnte festgestellt werden, daß die lytische Aktivität gegenüber anderen Bakterien in Zusammenhang mit der Ernährung der Myxobakterien steht, d. h. die Myxobakterien sind in der Lage andere lebende Mikroorganismen als Nahrung zu verwenden. (L. J. Solntzewa, 1939 und 1941; S. F. Sniesko, McAllister und Hitchner, 1941 und 1942; J. M. Beebe, 1941/42).

B. N. Singh (1947) konnte nachweisen, daß das lytische Prinzip der Myxobakterien durch eine Zellophanmembran hindurch zu diffundieren

vermag. Es handelt sich also bei der Lyse um einen ektofermentativen Vorgang.

Neben Bakterien fallen aber auch andere Mikroorganismen dem Auflösungsvermögen der Myxobakterien zum Opfer. *H. Oetker* (1953) konnte zeigen, daß auch lebende Hefen, Phycomyceten und Algen den Myxobakterien als Futterorganismen dienen können. *Katzberger*, *Kühlwein* und *Kausche* (1956) konnten sogar die Einwirkung auf Viren nachweisen.

Diese Eigenschaft vieler Myxobakterien, ihren Nährstoffbedarf durch Lyse anderer Mikroorganismen zu decken veranlaßte *F. J. Anscombe* und *B. N. Sing* (1948) ihnen die Bezeichnung „Mikroräuber“ zu verleihen.

Daß diese Mikroräuber auch vor höheren tierischen Organismen nicht zurückschrecken beweist die Mitteilung von *E. J. Ordal* und *R. R. Rucker* (1944), die ein Myxobakterium *Chondrococcus columnaris* als Erreger einer epidemischen Fischerkrankung (bei Lachsen!) ermitteln konnten.

Es ist naheliegend, daß diese Mikroräuber der freien Natur auch als anaerobe Varianten beim Menschen ihre Aggressivität bewahrt haben und mit Hilfe des ihnen eigenen Kriechvermögens Epithelschichten z. B. am Zahnfleischsaum zu durchdringen vermögen und dann mittels lytischer Fermente zu chronisch verlaufenden entzündlichen Prozessen führen.

3. Daß unsere Myxobakterien in der Lage sind Epithelschichten zu durchwandern, konnte experimentell nachgewiesen werden. Die für solche Versuche notwendige „sterile“ lebende Membran mit Epithelbedeckung fanden wir in der Chorioallantoismembran 10 Tage lang bebrüteter Hühnereier. Die Eier wurden entsprechend den Angaben von *W. O. Groß* und *J. Borneff* gefenstert und ein Tropfen einer flüssigen Myxobakterienkultur aufgeimpft. Nach Verschuß des Eies mit einem sterilen Glasplättchen wurde weiter bebrütet. Schon am 2. Tag war auf der Chorioallantoismembran eine pustelartige Gewebereaktion zu erkennen. Gleichzeitig konnte bei geöffneten Eiern festgestellt werden, daß sich in der Allantoisflüssigkeit lebendige, gut bewegliche Myxobakterien befanden. Die Myxobakterien hatten demnach die an beiden Flächen mit Epithel bedeckte Chorioallantoismembran durchwandert.

Durch Verimpfen einiger Tropfen Allantoisflüssigkeit auf Blutagar-Fortnerplatten konnten diese Befunde bei insgesamt 10 so beimpfter Eier bestätigt werden: Aus allen Allantoisflüssigkeiten waren Myxobakterien kultivierbar!

Die fast bei allen Versuchseiern auf der Chorioallantoismembran wahrnehmbaren Gewebsreaktionen sind jedoch mit größter Vorsicht zu

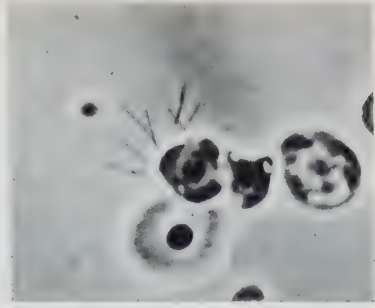


Abb. 39. Die Aufnahme zeigt einen mit Myxobakterien „gespickten“ Leukozyten aus der Pustel einer mit Myxobakterien infizierten Chorioallantoismembran. Vergr. 1:1000, Phasenkontrastaufnahme.

bewerten, da erfahrungsgemäß solche Veränderungen auch durch unspezifische Reize z. B. kleinste Eierschalenpartikel etc. häufig entstehen.

Als sehr charakteristisch jedoch hat es sich erwiesen, daß in den Läsionen der Chorioallantoismembran konstant eine große Anzahl von Leukozyten gefunden werden konnten, die mit Myxobakterien geradezu gespickt waren (Abb. 39). Die Myxobakterien waren mit ihren freien, aus dem Leukozyten herausragenden Enden z. T. noch gut beweglich, sie waren also noch am Leben.

Bei solchen Bildern drängt sich der Gedanke auf, ob hier nicht anstelle einer Phagozytose umgekehrt ein Angriff der Myxobakterien auf den Leukozyten vorliegt. Damit bestünden die Bezeichnungen „Cytophaga“ und „Mikroräuber“ zu recht.

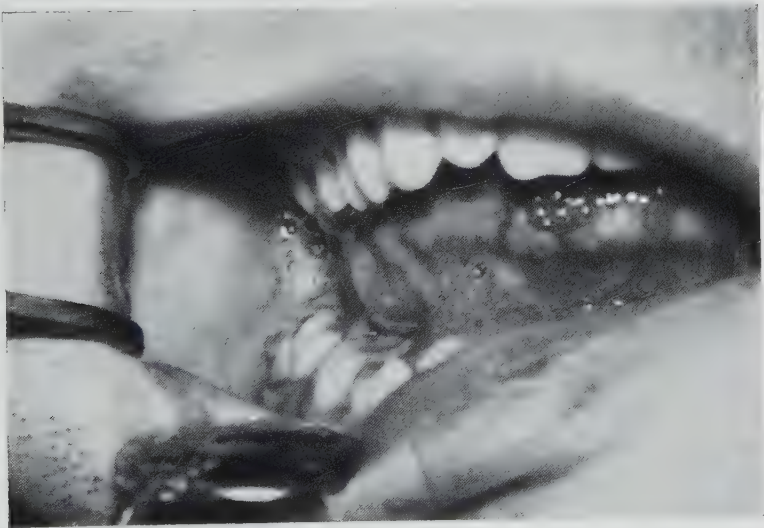


Abb. 40. Die Abbildung zeigt die betreffende Stomatitis ulcero-membranacea, die von 8 ausgehend die gesamte Gingiva und die übrige Mundhöhlenschleimhaut befallen hatte. Besonders im Bereich der Zungenspitze befanden sich ausgedehnte Ulcera. In den Geschwürsekreten waren fast ausschließlich anaerobe Myxobakterien vorhanden. (Aufnahme: Dr. Zähringer, Univ. Zahnklinik Erlangen.)

Kontrolluntersuchungen, die bei gleicher Technik mit drei echten Fusobakterienstämmen und einen aus der Mundhöhle stammenden anaeroben Spirillenstamm durchgeführt worden waren ergaben alle übereinstimmend, daß diese Keime schon nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar waren, also der Abwehrkraft des Eies zum Opfer gefallen waren.

4. Diese Versuche erhalten weiteres Gewicht durch einen klinischen Fall, der sehr für die Pathogenität der anaeroben Myxobakterien in der Mundhöhle spricht: An der Erlanger Universitäts-Zahn- und Kieferklinik kam ein junger Mann mit dem Krankheitsbild einer ausgedehnten, fieberhaften Stomatitis ulcero-membranacea zur stationären Aufnahme (Abb. 40).

Die von uns durchgeführte bakteriologische Untersuchung ergab, daß nicht wie erwartet eine typische Fusospirochätose vorlag, sondern daß in den Geschwürsflächen fast ausschließlich Myxobakterien vorhanden waren. Die Kultivierung zeigte, daß praktisch eine Reinkultur von *Sphaerocytophaga filiformis* vorgelegen hatte. Nachdem unter Antibiotikaverabreichung das Krankheitsbild in 8 Tagen abgeklungen war, konnten Myxobakterien in der Mundhöhlenflora nicht mehr nachgewiesen werden!

Diese vorläufigen orientierenden Versuche und Befunde lassen die Weiterführung und Ausdehnung entsprechender Versuche mit anaeroben Myxobakterien lohnend erscheinen. Die noch offenen Fragen, insbesondere in Hinblick auf die Pathogenität zu klären und durch ausgedehnte klinische Untersuchungen die gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen, soll Ziel und Zweck weiterer Untersuchungen sein.

Zusammenfassung

1. Aus der menschlichen Mundhöhle wurden anaerobe Keime gezüchtet, deren Hauptkennzeichen gleitend-kriechende Fortbewegung und starke Flexibilität sind. Einer starken morphologischen Ähnlichkeit mit Fusobakterien zufolge wurden diese Keime bisher fälschlicherweise dem Genus *Fusobakterium* als *Species F. girans* zugeordnet.

2. Die Keime sind strikt anaerob und wachsen auf Blutagarplatten im Fortnerkulturverfahren als weißlich-gelbe bis gelbe, schleimige, konfluierende Kolonien, die zumeist von einem hauchartigen Schwärmsaum umgeben sind. Die biochemischen Leistungen sind in proteolytischer und sacharolytischer Hinsicht schwach ausgeprägt.

3. Morphologisch sind die Keime gekennzeichnet durch fadenförmige oder spindelige Gestalt, fehlende Zellmembran und deutlich nachweisbare Kernäquivalente. Einen Geißelapparat besitzen sie nicht.

4. Der bisher unbekannte Bewegungsmechanismus der auf festen Unterlagen erfolgenden Gleitbewegungen konnte auf die Wirkung von spiralig die Zelloberfläche umlaufenden Schleimbändern zurückgeführt werden. Es besteht eine Art „Raupenantrieb“, wodurch die Keime unter gleichzeitiger Rotation um ihre Längsachse vorwärts bewegt werden.

5. Die Keime besitzen einen charakteristischen Lebenszyklus: Aus den vegetativen Zellen entstehen durch seitliche oder polare Ausstülpungen rundliche Gebilde, sog. Sphäroide, die aber von großer Hinfälligkeit sind und keinerlei Dauerformfunktion erfüllen. Aus den Sphäroiden entstehen durch Keimung wieder vegetative Zellen. Der Sinn dieser Vorgänge wird in autogamen Kernverschmelzungsvorgängen und damit verbundenen Genumgruppierungen gesehen.

6. In Vergleichsuntersuchungen wurde nachgewiesen, daß es sich bei den Keimen um anaerobe Myxobakterien handelt. Myxobakterien sind bisher nur als obligat aerobe Boden- und Dungbewohner bekannt.

7. Diese bis jetzt unbekannte Gruppe von anaeroben Myxobakterien beim Menschen wurden von uns als neues zusätzliches Genus *Sphaerocytophaga* in die Familie der Myxococcaceae eingeordnet. Auf morphologischer Basis konnten bisher zwei Species unterschieden werden:

Sphaerocytophaga filiformis

Sphaerocytophaga fusiformis

8. Die anaeroben Myxobakterien konnten als so häufiger Bestandteil in Sekreten von Fusospirochätosen der Mundhöhle nachgewiesen werden, daß eine Umbenennung dieser Erkrankungsprozesse in Myxo-fuso-spirochätose vorgeschlagen wird.

9. Die anaeroben Myxobakterien der Mundhöhle scheinen die, bei denjenigen der freien Natur häufig anzutreffende Eigenschaft andere lebende Mikroorganismen anzugreifen, beibehalten zu haben: Ihr Epitheldurchwanderungsvermögen wurde nachgewiesen. Bei einer ausgedehnten Stomatitis ulcero-membranacea waren anaerobe Myxobakterien praktisch ausschließlich im Sekret nachweisbar, was für die Pathogenität dieser Keime spricht.

10. In weiteren Untersuchungen soll das Vorkommen dieser neuen Keime in anderen Regionen des menschlichen Körpers (z. B. Verdauungstrakt, etc.) und die ihnen zukommende Pathogenität erforscht werden.

Summary

Filiform to spindle-shaped, anaerobic bacteria were isolated from the human oral cavity, exhibiting pronounced flexibility and a gliding motility. These organisms are not identical with the Fusobacteria (*F. girans*) with which they had been erroneously placed. The gliding motility is effected not by flagella but by mucilaginous bands running spirally around the cell. A characteristic life cycle, expressing itself in the formation of so-called spheroids, could be demonstrated with the electron microscope. When comparing the three essential characters of these bacteria: flexibility, gliding motility, and life cycle, with organisms of the order Myxobacterales, it became apparent that we were dealing with unknown anaerobic members of this order having so far escaped detection in man and animals. They were grouped with the family Myxococcaceae as the new genus *Sphaerocytophaga*, with the two species *Sph. filiformis* and *Sph. fusiformis*. The frequent occurrence of these myxobacteria in cases of fusospirochetosis makes it thus necessary to term this disease a myxo-fuso-spirochetosis, especially as it could be shown experimentally and clinically (Vincent's angina) that these anaerobic myxobacteria are probably pathogenic.

Résumé

On cultive des germes anaérobies issus de la cavité buccale de l'homme qui ont une forme allant du fil, au fuseau, une grande flexibilité et des mouvements de propulsion glissants. On a prouvé que ces germes n'ont rien à faire avec les fuso-bactéries (*F. girans*) parmi lesquels on les avait jusqu'ici faussement classés. Les germes non flagellés exécutent leurs mouvements de propulsion étranges et glissants au moyen de filaments muqueux en spirales qui tournent autour de la surface de la cellule. Par des photos optiques-électroniques, on a pu observer un cycle vital caractéristique de ces germes qui trouve son expression dans la formation des soit-disant sphéroïdes. Les 3 propriétés essentielles: la flexibilité, la propulsion glissante et le cycle vital caractéristique ont prouvé dans des expériences comparatives que ces germes sont des myxobactéries anaérobies inconnues jusqu'ici, chez l'homme comme chez l'animal. On a classé ces myxobactéries dans la famille des myxococcaceae comme nouveau genre *spaerocytophage* avec deux espèces: *Sph. filiformis* et *Sph. fusiformis*. La présence fréquente de ces myxobactéries en cas de fusospirochétoses rend nécessaire une modification dans la désignation de cette maladie qui s'appellera *myxo-fuso-spirochétose*, d'autant plus que dans les expériences et les cliniques (stomatitis ulcerosa) la pathogénicité de ces myxobactéries anaérobies apparaît vraisemblable.

Schrifttum

- Anscombe, F. J. u. B. N. Singh, *Nature* **161** (1948): 140 — Baird-Parker, A. G., *J. gen. Microbiol.* **22** (1960): 458 — Beebe, I. M., *J. Bact.* **42** (1941): 193 — Beebe, I. M. u. Buchanan, *Bergey's manual*, S. 1005 — Berger, U., *Zbl. Bakt. I. Org.* **166** (1956): 484 — *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 6th ed. 1948 — Bernheim, J. u. D. Pospischill, *Jb. Kinderhk.* **46** (1898): 434 — dies., *Zbl. Bakt. I. Org.* **23** (1898): 177 — Bisset, K. A., *The cytology a. life-history of bacteria*, Edingburgh u. London 1955 — Beerens, H., *Ann. Inst. Pasteur* **82** (1952): 235 — Boe, J., *Fusobakterium*, Oslo 1941 — Correns, C., *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **15** (1897): 139 — Costa, S., *Compt. rend. Soc. biol.* **67** (1909): 866 — Dean, R. D. u. M. T. Dean, *J. Dent. Res.* **11** (1931): 759 — Dienes, L. u. W. E. Smith, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **51** (1942): 287 — dies., ebda. **53** (1943): 195 — Ellermann, E., *Zschr. Hyg.* **56** (1907): 453 — Fechner, R., *Zschr. Bot.* **7** (1915): 289 — Graupner, Münch. med. Wchschr. **49** (1902): 727 — Gins, A. H., *Zschr. Hyg.* **124** (1942): 460 — Groß, W. O. u. J. Borneff, *Arch. Hyg.* **138** (1954): 11 — Harder, R., *Zschr. Bot.* **9** (1917): 145 — Hemmens, E. S. u. R. W. Harrison, *J. Infect. Dis.* **70** (1942): 131 — Henrici u. Johnson, *J. Bact.* **29** (1935): 4 — dies., ebda. **30** (1935): 83 — Henriksen, S. D., *Acta path. mikrobiol. Scand.* **14** (1937): 570 — Hine, M. K. u. G. P. Berry, *J. Bact.* **34** (1937): 517 — Hutchinson, H. B. u. J. Clayton, *J. Bact.* **9** (1919): 143 — Jarosch, R., *Protoplasma* **50** (1959): 277 — Katzberger, I., H. Kühlwein u. G. A. Kausche, *Zbl. Bakt. II Org.* **109** (1956): 478 — Klieneberger-Nobel, E., *J. Hyg. (Cambridge)* **45** (1947): 107 — Knorr, M., *Zbl. Bakt. I. Org.* **89** (1922): 4 — Kolkwitz, R., *Ber. dtsch. Bot. Ges.* **15** (1897): 460 — Krassilnikov, N. A., *Diagnostik d. Bakt. u. Actinom.* Jena 1959 — Krumwiede, Ch. u. J. Pratt, *J. Infect. Dis.* **12** (1913): 199 — dies., ebda. **13** (1913): 438 — Krzemieniewska, H., *Arch. Mikrobiol.* **4** (1933): 394 — Leiner, K., *Zbl. Bakt. I. Org.* **43** (1907): 7 — MacDonald, I. B., *The motile non-sporulating anaerobic rods of the oral cavity*, Toronto 1953 — Malek, I. u. J. Malková, *Zbl. Bakt. I. Org.* **143** (1938): 126 — Meyer-Pietschmann, K., *Arch. Mikrobiol.* **16** (1951): 163 — Morris, E. O., *J. Hyg.* **51** (1953): 49 — Mühlens, P. u. M. Hartmann, *Zschr. Hyg.* **55** (1906): 81 — Müller, R., *Medizinische Mikrobiologie*, München 1950 — Ordal, E. J. u. R. R. Rucker, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **56** (1944): 15 — Oetker, A., *Arch. Mikrobiol.* **19** (1953): 206 — Plaut, H. C., *Zbl. Bakt. I. Org.* **44**

(1907): 310 — *Prévot, A. R.*, Compt. rend. Soc. Biol. **133** (1940): 246 — *Rippel-Baldes, A.*, Grundriß d. Mikrobiologie. Berlin 1955 — *Rosebury, T.*, Oral surg. **5** (1952): 363 — *Sanarelli, C.*, Ann. Inst. Pasteur **41** (1927): 679 — *Séguin, F.* u. *R. Vinzent*, Ann. Inst. Pasteur **67** (1941): 37 — *Shmamine, T.*, Zbl. Bakt. I. Org. **65** (1912): 311 — *Singh, B. N.*, J. gen. Microbiol. **1** (1947): 1 — *Smith, D. T.*, Oral spirochetes a. related organisms in fusospirochetal diseases. London 1932 — *Sniesko, S. F.*, *MacAllister* u. *Hitchner*, J. bact. **41** (1941): 26 — *Solntzewa, L. J.*, Mikrobiol. (Moskau) **8** (1939): 700 — *Speyer, E.*, Arch. Mikrobiol. **18** (1953): 245 — *Stanier, R. Y.*, J. Bact. **40** (1940): 629 — *Schmid, G.*, Flora **3** (1918): 327 — *ders.*, Jb. Bot. **68** (1923): 328 — *Schulz, G.*, Arch. Mikrobiol. **21** (1955): 335 — *Tunnickliff, R.*, J. Infect. Dis. **33** (1923): 147 — *Ulrich, H.*, Planta **8** (1926): 295 — *ders.*, ebda. **9** (1929): 144 — *Varney, Ph.*, J. Bact. **13** (1927): 275 — *Veszpremi, D.*, Zbl. Bakt. **44** (1907): 332 — *Vincent, H.*, Ann. Inst. Pasteur **10** (1896): 488 — *Winogradsky, S.*, Ann. Inst. Pasteur **43** (1929): 549 — *Zschniegner*, Zahnärztl. Rdsch. **55** (1946): 155.

